

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Nephrologie
am Zentrum für Innere Medizin

**Bedeutung der Endothelinrezeptoren
für die Endothelin- und Noradrenalin- induzierte
Vasokonstriktion
bei Patienten mit Arteriosklerose**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Natalie Claudia Annegret **Yaldizli**, geb. Detmer
aus Osnabrück
2011

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. A. Mitchell
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. B. Levkau

Tag der mündlichen Prüfung: 21. März 2012

Für meine liebe Familie

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	5
1.1 Aufbau der Blutgefäße	7
1.2 Das Endothelinsystem	8
1.3 Klinische Anwendung von Endothelinrezeptorantagonisten	11
1.4 Das Sympathische Nervensystem	12
1.4.1 Noradrenalin	12
1.5. Interaktionen zwischen dem Endothelinsystem und dem Sympathischen Nervensystem	13
1.6 Bedeutung des Endothelinsystems für die Entstehung der Arteriosklerose	14
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	16
2. Patienten und Methoden	17
2.1 Allgemeine Richtlinien	17
2.2 Ein und Ausschlusskriterien	17
2.3 Studiendesign	18
2.4 Ablauf im Einzelnen	18
2.5 Patienten	19
2.6 Methoden	20
2.6.1 Verwendete Pharmaka und Prüfsubstanzen	20
2.6.2 BQ 123	19
2.6.3 BQ 788	21
2.6.4 Nitropussid-Natrium	21
2.6.5 Triple-Injektionstechnik	21
2.6.6 Laser-Doppler-Flussmessung	24
2.6.7 Das Prinzip des Laser-Doppler Scanner Moor LDI 3.01	25
2.6.8 Blutdruck und Herzfrequenzmessung	26

2.6.9 Ermittlung der Fluxwerte und Datenverarbeitung	26
2.7 Statistische Auswertung	27
3. Ergebnisse	29
3.1 Ruheperfusion	29
3.2 Wirkung von Endothelin-1 alleine und in Kombination mit den selektiven Endothelinantagonisten	32
3.3 Wirkung von Noradrenalin alleine und in Kombination mit den selektiven Endothelinantagonisten	35
3.4 Wirkung von BQ123 und BQ788 isoliert	38
3.4.1 BQ 123	38
3.4.2 BQ 788	39
4. Diskussion	40
4.1 Bemerkungen zur Methodik	40
4.2 Bemerkungen zum untersuchten Kollektiv	41
4.3 Bemerkungen zum Endothelinsystem in der Entstehung der Arteriosklerose	43
4.4 Bemerkungen zu Interaktionen zwischen dem Sympathischen Nervensystem und dem Endothelinsystem	43
4.5 Diskussion der Ergebnisse	44
5. Zusammenfassung	50
6. Literaturverzeichnis	52
7. Abkürzungsverzeichnis	59
8. Danksagung	60
9. Lebenslauf	61

1. Einleitung

Ziel der Kreislaufregulation ist es, die Durchblutung einzelner Organsysteme dem jeweiligen Bedarf anzupassen und den Blutdruck in den Blutgefäßen konstant zu halten. Das Vegetative Nervensystem, das Renin-Angiotensin-System und das Endothelinsystem stellen die großen kreislaufregulierenden Systeme im menschlichen Körper dar. Diese Systeme stehen über komplexe Interaktionen miteinander in Verbindung und regulieren über verschiedene Transmitter den Tonus der Blutgefäße.

Das Vegetative Nervensystem beeinflusst neben lebenswichtigen Funktionen wie Herzschlag, Atmung, Blutdruck, Verdauung und Stoffwechsel auch die Sexualorgane, Drüsen und die inneren Augenmuskeln. Man gliedert das Vegetative Nervensystem nach funktionellen und anatomischen Gesichtspunkten in den Sympathikus und den Parasympathikus, die oft antagonistische Wirkungen zeigen. Über den Sympathikus werden vor allem anregende, leistungsfördernde, ergotrope Reize vermittelt, während der Parasympathikus gegenläufige erholungsfördernde, trophotrope Impulse steuert. Wichtigster Neurotransmitter im Sympathischen Nervensystem ist das Noradrenalin (NA; Lüllmann, K.L., Mohr, K.M., 1999).

Das Endothelinsystem besteht aus dem Endothel, welches die Innenwände der Gefäße auskleidet und verschiedenen Endothelinen. Die Endotheline sind Moleküle, die vom Endothel synthetisiert werden und über verschiedene Rezeptoren am Gefäßsystem unter anderem Einfluss auf den Gefäßmuskeltonus nehmen (Hori et al. 1992). Das wichtigste Endothelin ist das Endothelin-1 (ET-1). Ende der 1980er Jahre wurde ET-1 aus pulmonalen und systemischen arteriellen Endothelzellkulturen isoliert und gilt heute als stärkste vasokonstringierende Substanz im menschlichen Organismus (Yanagisawa et al. 1988).

Störungen der Kreislaufregulationssysteme können zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen. So konnte in vielen Studien eine Aktivierung des Sympathischen Nervensystems bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen

nachgewiesen werden (Sinski et al. 2006). Therapeutisch führt die Hemmung des Sympathikus durch z.B. Beta-Rezeptoren-Blocker oder Alpha-Rezeptoren-Blocker zu einer Puls- und Blutdrucksenkung. Diese Wirkstoffgruppen gehören heute zur Standardbehandlung der arteriellen Hypertonie und Herzinsuffizienz (Leitlinien der Deutschen Hochdruckliga, 2008). Auch eine Aktivierung des Endothelinsystems, z.B. in Form erhöhter ET-1 Plasmaspiegel, ist für kardiovaskuläre Erkrankungen beschrieben.

Eine wichtige Erkrankung, die vielen Herz-Kreislauf-Erkrankungen zugrunde liegt, ist die Arteriosklerose. Pathoanatomisches Kennzeichen dieser Krankheit ist die irreversible, progrediente Verhärtung der Arterienwand. Eine endotheliale Schädigung geht der Arteriosklerose voraus. Wichtigste und potentiell lebensbedrohliche Folgeerkrankungen der Arteriosklerose sind unter anderem Herzinfarkt und ischämischer Schlaganfall.

Herz-Kreislauferkrankungen gehören zu den häufigsten Erkrankungen in der westlichen Welt und sind führende Todesursache in Deutschland, weit vor den Krebserkrankungen. In Deutschland waren im Jahre 2008 über 40% der Todesfälle auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen.

(Statistisches Bundesamt, 2009). Die hohe Prävalenz der kardiovaskulären Erkrankungen unterstreicht die Bedeutung der Forschung in diesem Gebiet.

1.1 Aufbau der Blutgefäße

Im menschlichen Organismus werden verschiedene Arten von Blutgefäßen unterschieden: Arterien, Venen und Kapillaren. Der Wandaufbau dieser Gefäße ist je nach ihrer Lage im Kreislaufsystem und ihrer daraus resultierenden Funktion unterschiedlich. Die Gefäßwand ist dreischichtig aufgebaut. Man unterscheidet in den Gefäßen von außen nach innen die Tunica adventitia (Adventitia), die Tunica media (Media) und die Tunica Intima (Intima). Die Adventitia ist als äußerste Schicht für die Verankerung der Gefäße im umliegenden Gewebe verantwortlich. Sie besteht zum größten Teil aus Bindegewebsfasern wie Elastin sowie Kollagen und enthält viele vegetative Fasern, die bei der Steuerung des Gefäßtonus mitwirken. Die Media besteht aus einer Schicht ringförmig angeordneter glatter Muskelzellen mit eingelagertem Elastin, Kollagen und Proteoglykanen. Das Verhältnis von elastischem Bindegewebe zu glatter Muskulatur ist abhängig von der Funktion des Gefäßes. Die arteriellen Blutgefäße besitzen die dickste Muskelschicht. In großen Gefäßen findet man häufig zusätzlich eine Membrana elastica externa, welche die Media von der Adventitia trennt. Die Intima setzt sich aus einer Basalmembran (Membrana elastica interna) und dem einschichtigen Endothel, welches die Gefäßinnenwand vollständig auskleidet, zusammen. Das Endothel ist mit einer Oberfläche von 500 Quadratmetern das größte Organ des menschlichen Körpers. Es besteht aus einer dünnen Schicht Endothelzellen, welche die Blutgefäße von innen auskleidet und eine natürliche Barriere zwischen Blut und Gewebe bildet. Das Endothel ist aber nicht nur eine Grenzschicht; es produziert zahlreiche endokrine und autokrine Hormone. Das Endothel ist in der Lage sowohl vasodilatierende Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin, als auch vasokonstringierende Stoffe wie Thromboxan und ET-1 zu synthetisieren und zu sezernieren und ist so direkt an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt (Mitchell et al. 2008).

1.2 Das Endothelinsystem

Zum Endothelinsystem gehören das Endothel, die Endotheline und die verschiedenen Endothelin-Rezeptoren. Endothelin ist ein Peptid, bestehend aus 21 Aminosäuren. Es ist in mehreren Isoformen nachweisbar (ET-1, ET-2, ET-3) (Yanagisawa et al. 1988). Beim Menschen scheint vor allem das ET-1 eine wichtige Rolle zu spielen (Abbildung 1). Am Gefäßsystem beeinflusst ET-1 über ET_A - und ET_B -Rezeptoren den Gefäßtonus (Haynes et al. 1995).

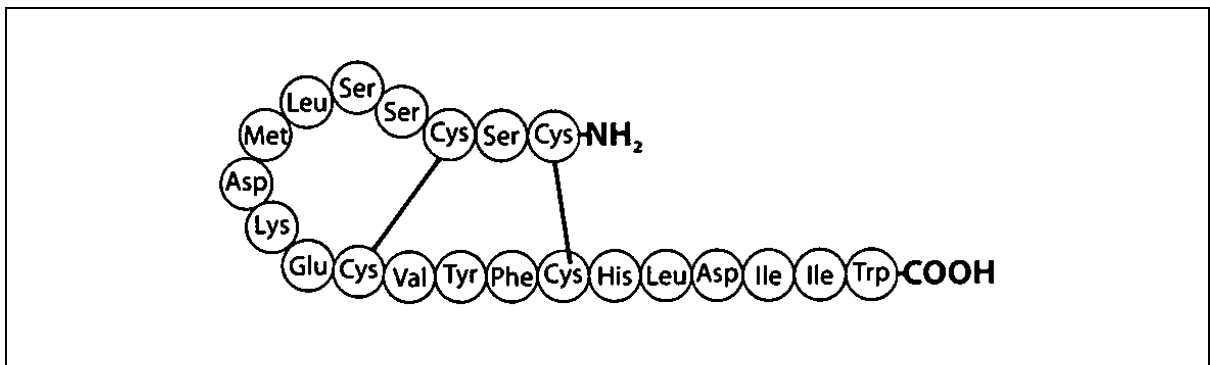


Abbildung 1: Aufbau von Endothelin-1 (Yanagisawa et al. 1988).

Neben direkten vasomotorischen Effekten wird ET-1 auch eine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen im Rahmen der Arteriosklerose zugeschrieben. ET-1 aktiviert Makrophagen, fördert die Neutrophilen-Adhäsion und steuert über Ausschüttung von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor-Alpha, Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-8 Entzündungsvorgänge in der arteriosklerotischen Gefäßwand (Rütten et al. 1997, Hofman et al. 1998, Hoyer et al. 2005).

Zudem scheinen ET_B -Rezeptoren an der fetalen Organentwicklung beteiligt zu sein. So versterben Mäuse mit einem generalisierten ET_B -Rezeptoren-Defekt postpartal rasch an den Folgen einer intestinalen Agangliose, einer dem Morbus Hirschsprung ähnlichen Erkrankung. Zudem treten Pigmentstörungen der Haut auf (Hosoda et al. 1994, Gariepy et al. 1996). Genetische Information für die unterschiedlichen Isoformen der Endotheline ist auf verschiedenen Chromosomen kodiert. Das Gen für das im humanen System dominierende ET-1 ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert. Nach Transkription erfolgt zunächst die Synthese eines Vorläuferproteins, des sogenannten präpro-ET mit 212 Aminosäuren. Durch

mehrfache proteolytische Spaltung wird aus präpro-ET über die Zwischenprodukte pro-ET und big-ET beim Menschen vor allem ET-1. Die Transformation zum biologisch aktiven ET-1 erfolgt hauptsächlich über das Endothelin-Converting-Enzym (ECE). In geringen Mengen sind auch Mastzell- und Muskelzell-Chymasen sowie Metalloproteasen an dieser Aktivierung beteiligt (Lüscher et al. 2000).

Die vorwiegende Regulation der ET-1-Synthese findet auf der Ebene der Translation des präpro-ET statt. Verschiedene Faktoren einschließlich NA, Angiotensin II und Vasopressin, oxidiertes low-density lipoprotein (LDL)-Cholesterol, Glukose, Östrogenmangel, prokoagulatorische Mediatoren wie Thrombin, Wachstumsfaktoren, Zytokine sowie Hypoxie und mechanische Faktoren (Scherstress), stimulieren die Bildung von ET-1. Dagegen hemmen Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandine die Synthese (Goddard et al. 2000). Zudem können Proteinkinase C, Zytokine sowie ET_B-Rezeptoren und ET-1 selbst die Expression von ECE beeinflussen.

ET-1 ist hydrophil und wird überwiegend in Endothelzellen produziert, wobei auch in glatten Muskelzellen (Rossi et al. 1999), Kardiomyozyten, Mesangiumzellen, Leukozyten und Makrophagen Endotheline gebildet werden können (Ehrenreich et al. 1990).

Die Freisetzung des ET-1 erfolgt mittels Exozytose über spezifische Sekretionsvesikel zu ca. 80% abluminal in das umliegende Gewebe (parakrin) und zu ca. 20% in das Gefäßlumen (endokrin) (Wagner et al. 1992). Der Plasmaspiegel von ET-1 ist deshalb unter physiologischen Bedingungen sehr niedrig. Er beträgt beim Erwachsenen im Durchschnitt 1-2 pg/ml. ET-1 hat eine relativ kurze Halbwertszeit von 4-7 Minuten (Hoeper et al. 2005). Von den Zielzellen aufgenommen, wird ET-1 rasch durch Endopeptidasen hydrolysiert.

ET-1 vermittelt seine Wirkung über verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Bislang wurden fünf verschiedene Rezeptoren beschrieben. Beim Menschen dominieren der ET_A- und der ET_B-Rezeptor. Hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Gefäßmuskeltonus werden ET_B-Rezeptoren in vasodilatierend wirkende ET_{B1}- und vasokonstringierend wirkende

ET_{B2}-Rezeptoren unterteilt. Im Gefäßsystem befinden sich die ET_A- sowie die ET_{B2}-Rezeptoren vorwiegend auf den glatten Gefäßmuskelzellen, die ET_{B1}-Rezeptoren hingegen hauptsächlich auf den Endothelzellen (Ogawa et al. 1991, Haynes et al. 1995). ET_B-Rezeptoren konnten auch auf Makrophagen nachgewiesen werden. Die Stimulation von ET_A- und ET_{B2}-Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen führt über die Aktivierung der Phospholipase C zu einem Anstieg von Inositol-Triphosphaten, Diacylglycerol sowie intrazellulärem Kalzium. Dies verursacht eine anhaltende Vasokonstriktion (Resink et al. 1988, Griendling et al. 1989, Kodama et al. 1989). Die Aktivierung der endothelialen ET_{B1}-Rezeptoren hingegen bewirkt über eine Freisetzung von NO und Prostazyklin eine Vasodilatation (Abbildung 3) (Goddard et al. 2000, Zollmann et al. 2000, Wenzel et al. 2001, Haynes et al. 1995).

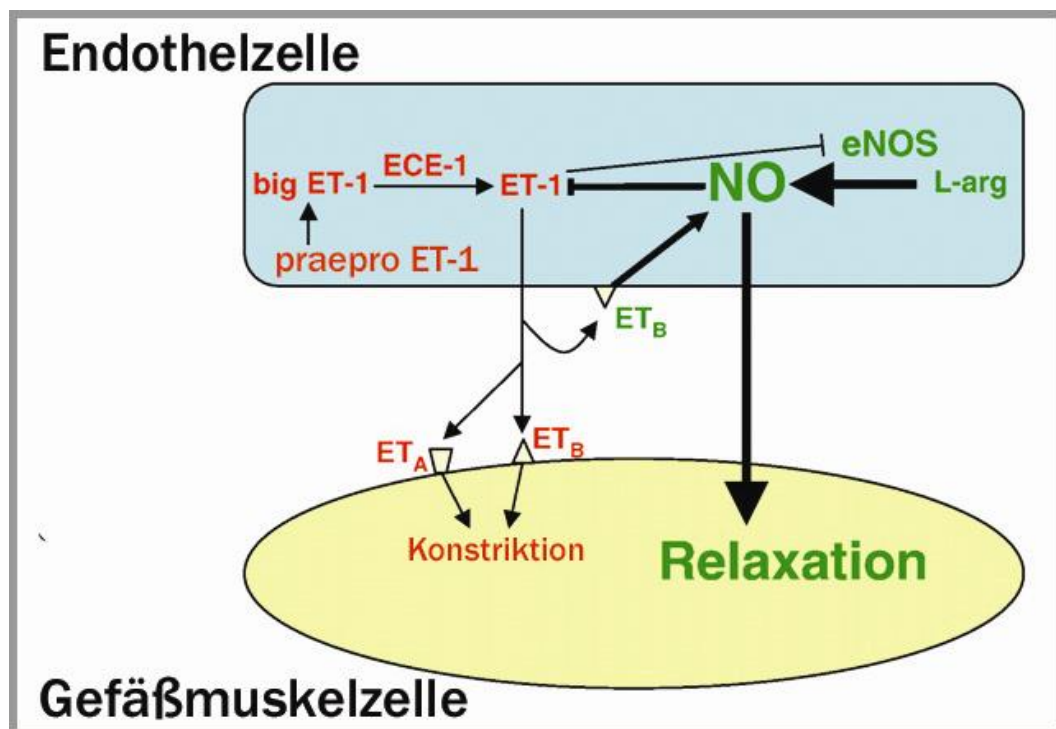


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Endothelin-Rezeptor-Funktion. (Böhm et al. 2007)

1.3 Klinische Anwendung von ET-Rezeptorantagonisten

ET-Rezeptorantagonisten stellen eine relativ neue Substanzgruppe dar. Unterschieden wird zwischen dual wirksamen ET-Rezeptorantagonisten, die sowohl auf ET_A- wie auf ET_B-Rezeptoren wirken und den selektiven ET_A- oder ET_B-Rezeptorantagonisten.

Bosentan ist ein dualer oraler ET-Rezeptorantagonist, der für die Behandlung der Pulmonal-arteriellen Hypertonie im WHO Stadium III bereits 2001 in Deutschland, 2002 in Europa und für das WHO Stadium II 2008 in Europa zugelassen wurde (Rubin et al. 2002, Channick et al. 2001, Galie et al. 2008). Auch bei Patienten mit Sklerodermie ist Bosentan wirksam (Korn et al. 2004) und seit 2007 zur Behandlung digitaler Ulzera in Europa zugelassen.

Die Etablierung von Bosentan in der Therapie weiterer Erkrankungen wie z.B. der portopulmonalen Hypertonie (Koexistenz von pulmonaler Hypertonie und portaler Hypertonie bei vorbestehender Leberzirrhose) ist Gegenstand aktueller Forschung (Hoepfer et al. 2005, Hoepfer et al. 2006). Inzwischen stehen auch mehrere selektive orale ET_A-Rezeptorantagonisten zur Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie zur Verfügung.

Die Rolle des Endothelinsystems in der Entstehung der arteriellen Hypertonie ist bis heute nicht geklärt. In einer von Krum et al. durchgeführten Studie war der blutdrucksenkende Effekt von Bosentan mit dem Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer Enalapril vergleichbar. Um diesen Effekt zu erreichen waren jedoch Dosierungen bis zu 2000 mg/Tag notwendig (Krum et al. 1998).

Auch der selektive orale ET_A-Rezeptorantagonist Darusentan, der bisher nur experimentell eingesetzt wurde, wirkte in einer multizentrischen Studie bei 392 Hypertonikern in einer Dosierung zwischen 10-100 mg/Tag antihypertensiv (Nakov et al. 2002). In einer Phase 2 Studie von Black et al. konnten diese Daten im Jahre 2007 bestätigt werden. Bei 115 Patienten mit therapieresistenter arterieller Hypertonie unter antihypertensiver Dreifachkombination, konnten mit Darusentan

in einer Dosierung zwischen 10-300 mg/Tag, gute additive antihypertensive Effekte ohne relevante Nebenwirkungen erreicht werden (Black et al. 2007).

Dies konnte in einer Folgestudie von Weber et al. in 2009 bestätigt werden. Hier konnte bei 240 Patienten mit therapieresistenter Hypertonie durch die Behandlung mit Darusentan über 14 Wochen in den Dosierungen 50 mg, 100 mg und 300 mg/Tag ebenfalls gute antihypertensive Wirkungen erreicht werden. Es konnten dabei keine dosisabhängigen Wirkungen auf den Blutdruck gezeigt werden (Weber et al. 2009). Die Herstellerfirma (Gilead Sciences) strebt aktuell in den USA die Zulassung zur Behandlung der therapieresistenten arteriellen Hypertonie an.

1.4 Das Sympathische Nervensystem

Das Sympathische Nervensystem ist Teil des Vegetativen Nervensystems. Es setzt sich aus unterschiedlichen Kerngebieten im Hirnstamm, des Hypothalamus sowie übergeordneten Kerngebieten im Boden des dritten Ventrikels zusammen. Ihre Axone ziehen über das Rückenmark zu den Ganglienzellen des Grenzstranges (Truncus sympathicus) und werden dort auf das zweite Neuron umgeschaltet (Neurotransmitter: Acetylcholin). Von dort ziehen sie als postganglionäre Fasern in die Peripherie. Als spezifischer Transmitter zwischen postganglionären Fasern und Erfolgsorgan wirkt Noradrenalin (NA) (Lüllmann, K.L., Mohr, K.M., 1999).

1.4.1 Noradrenalin

NA wird in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes über verschiedene Zwischenstufen (L-Dopa, Dopamin) durch enzymatische Spaltung aus der essentiellen Aminosäure L-Tyrosin gebildet und in spezifischen von einer Membran umhüllten Granula gespeichert. Die Sekretion von NA wird durch neuronale Reize ausgelöst (Lüllmann, K.L., Mohr, K.M., 1999). NA ist ein wichtiger Transmitter im Sympathischen Nervensystem und wirkt stark vasokonstringierend. Es übt seine Wirkung über G-Protein-gekoppelte α - und β - Rezeptoren aus. Im Gefäßsystem vermittelt es seine Wirkung hauptsächlich über α -Rezeptoren. Die

Vasokonstriktion wird dabei vor allem über α_1 -Rezeptoren der glatten Gefäßmuskelzellen ausgelöst. Die Signaltransduktion erfolgt hierbei über eine Aktivierung der Phosphoinositid-spezifischen Phospholipase C, die kaskadenartig zu einem Anstieg von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) führt. IP3 setzt Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum frei und aktiviert über Calmodulin die Myosin-Leichtketten- Kinase, was zur einer Kontraktion der glatten Muskulatur führt (Lüllmann, K.L., Mohr, K.M., 1999, Gulbins, E., Lang F. 2005). Über α_2 -Rezeptoren hingegen kann NA durch den Einstrom von Kalzium- Ionen aus dem Extrazellularraum die Freisetzung von NO aus der Endothelzelle bewirken und damit eine Vasodilatation auslösen (Gulbins, E., Lang F. 2005, Richardson et al. 1999). Das durch den neuronalen Reiz freigesetzte NA verteilt sich durch Diffusion. Ein relativ kleiner Teil erreicht so die entsprechenden Rezeptoren an der Plasmamembran der Zielzelle und wird vorübergehend am entsprechenden Rezeptor gebunden. Bis zu 90% wird direkt vom freigesetzten Neuron wieder resorbiert und in Vesikeln gespeichert. Der übrige Teil unterliegt dem Abtransport durch Kapillaren, zerfällt spontan, oder wird nach einigen Sekunden durch Monoaminoxidasen zu Vanillinmandelsäure, welche im Harn ausgeschieden wird, abgebaut. Seine Halbwertszeit ist mit 1-3 Minuten daher sehr kurz (Lüllmann, K.L., Mohr, K.M., 1999).

1.5 Interaktionen zwischen dem Endothelinsystem und dem sympathischen Nervensystem

Eine Reihe von in vitro- und tierexperimentellen Arbeiten weisen auf Interaktionen zwischen dem Endothelinsystem und dem Sympathischen Nervensystem hin.

Kuwaki et al. konnten in Zellen des Vegetativen Nervensystems von Mäusen (in der rostroventrolateralen Medulla oblongata und dem chromaffinen Gewebe des Nebennierenmarkes) ET-Rezeptoren und ET-1 nachweisen (Damon et al.1999, Kuwaki et al. 1999). Zudem können präsynaptisch lokalisierte ET_B-Rezeptoren im Sinne eines auto-feedback Mechanismus die Freisetzung von NA aus adrenergen Fasern hemmen (Garcia-Villalon et al. 1999). ET-1, intraventrikulär injiziert, führte bei Ratten zu einer Zunahme von Herzfrequenz und Blutdruck. Diese Effekte konnten durch den Ganglienblocker Hexamethonium gehemmt werden, was für

eine Aktivierung der zentralen Sympathikusaktivität durch ET-1 spricht (Kawano et al. 1989).

Weitere Tierexperimente an Mäusen konnten zeigen, dass der zentrale durch Kohlendioxid stimulierte Atemantrieb zum Teil über zentralvenöse ET_A-Rezeptoren vermittelt wird. Eine Blockade der ET_A-Rezeptoren führte zu einem verminderten Atemantrieb in Hyperkapnie (Kuwaki et al. 1999). Jiang et al. konnten bei Mäusen eine NA-induzierte Vasokonstriktion der Aorta ex-vivo durch den selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten BQ123 inhibieren (Jiang et al. 2000).

Wenzel et al. konnten in der hiesigen Klinik beim Menschen eine durch NA und Angiotensin II ausgelöste Vasokonstriktion in der Hautmikrozirkulation sowohl durch eine lokale Gabe des selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten BQ123 als auch durch den systemisch wirkenden oralen ET_A-Rezeptorantagonisten Darusentan inhibieren. Zudem konnte in einer Arbeit von Gössl et al. durch ET-1 eine Potenzierung der NA- und Angiotensin II- vermittelten Vasokonstriktion in der Hautmikrozirkulation erreicht werden (Wenzel et al. 2001, Gössl et al. 2004).

In einer anderen Studie führten eine experimentell induzierte Hypoxie sowie mentaler Stress, induziert durch einen spontan durchgeführten Rechentest, bei gesunden, normotensiven Männern zu einer Aktivierung des Sympathikus (mikroneurographisch gesteigerte Aktivität des N. peroneus) und zu einer Erhöhung des NA- und ET-1-Plasmaspiegels (Noll et al. 1996).

1.6 Bedeutung des Endothelinsystems für die Entstehung der Arteriosklerose

Eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Arterioskleroseentwicklung scheint die Aktivierung des Endothels zu spielen. Durch Scherkräfte an der Intima, Hypoxie, oxidiertes LDL-Cholesterol, hohe Glukosespiegel, Östrogenmangel oder prokoagulatorische Mediatoren wie Thrombin, kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von ET-1 (Hoeper et al. 2005). ET-1 führt nicht nur zu einer Vasokonstriktion, sondern induziert über die Aktivierung von Makrophagen und die Ausschüttung verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren eine Entzündungsreaktion in der Gefäßwand (Rütten et al. 1997, Hofman et al. 1998, Hoeper et al. 2005, Böhm et al. 2007).

Dadurch kommt es zu einer vermehrten Expression verschiedener Leukozyten-Adhäsionsmoleküle. Diese erleichtern die Migration von Leukozyten in die Gefäßinnenwand. Während dieser Diapedese differenzieren sich Monozyten zu Makrophagen und exprimieren nun neue Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche, sogenannte Scavenger-Rezeptoren. Darüber können sie oxidiertes LDL-Cholestrol binden und durch Phagozytose ins Zytoplasma einschliessen. Diese mit Fettkörperchen überladenen Makrophagen nennt man Schaumzellen. Sie bilden die Grundlage der arteriosklerotischen Plaques und sind in der Lage pro-inflammatorische Zytokine auszuschütten (Libby et al. 2002). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Proliferation von Fibroblasten um die Schaumzellen herum. Eine besondere Rolle scheinen hierbei die mitogenen Effekte des ET-1 zu spielen (Weissberg et al. 1990, Ohlstein et al. 1992, Shi et al. 1996). Es kommt dabei zunächst zu einer Verdickung der Adventitia. Im weiteren Verlauf durchdringen die Fibroblasten die Media der erkrankten Gefäße um sich an der Intima anzulagern (Schwartz et al. 1995). Das vermehrte Einsprossen der Fibroblasten führt an diesen Stellen zu einer Zunahme des Bindegewebes. Hier können sich weitere Lipoproteine, Cholesterin- sowie Kalziumkristalle anlagern. ET-1 steigert nicht nur die Proliferation von Fibroblasten, sondern auch von glatten Muskelzellen der Media. Es stimuliert die Kollagenbiosynthese und aktiviert Thrombozyten. Aktivierte Thrombozyten fördern die Migration von glatten Muskelzellen und stimulieren ihrerseits die Kollagenbiosynthese über den transforming growth factor- β (TFG- β) (Libby et al. 2002). Dieser komplexe Prozess führt über einen längeren Zeitraum zur Bildung herdförmiger Gewebeveränderungen, sogenannter arteriosklerotischer Plaques, die für das mikroskopische Bild der Arteriosklerose charakteristisch sind und zur progredienten Einengung des Gefäßlumens führen.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle der Endothelinrezeptoren in der Mikrozirkulation von Patienten mit Arteriosklerose.

Die Hypothese war, dass aufgrund der Endothelpathologie bei Arteriosklerose die ET-1 induzierte Vasokonstriktion in der Mikrozirkulation nicht nur über ET_A-Rezeptoren, sondern auch über konstringierend wirkende ET_B-Rezeptoren vermittelt wird.

Ausserdem sollten mögliche Wechselwirkungen zwischen den Transmittern des Sympathischen Nervensystems und dem Endothelinsystem auf lokaler Ebene dargestellt werden.

2 Patienten und Methoden

2.1 Allgemeine Richtlinien

Das Protokoll dieser Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen genehmigt. Es bestanden keine Interessenkonflikte der Studienleiter mit dieser Arbeit.

2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Einschlusskriterien der Studie waren:

- Männer und postmenopausale Frauen im Alter zwischen 45-85 Jahren mit koronarer Gefäßerkrankung, periphere arterieller Verschlusskrankheit oder einer duplexsonographisch nachgewiesenen Arteriosklerose.

Die Ausschlusskriterien der Studie waren:

- Aktive Hauterkrankungen
- Erhöhte Infektparameter (CRP, Leukozyten)
- Insulinpflichtiger Diabetes mellitus
- Blutgerinnungsstörungen (abnorme INR und PTT-Werte)
- Orale Antikoagulation
- Elektrolytstörungen
- Erhöhung der Transaminasen über das Dreifache der Norm
- Kreatinin > 1,5 mg/dl
- Überempfindlichkeit gegen einen der Wirkstoffe (ET-1, NA, BQ123, BQ788, Nitropussidnatrium)
- Fehlende schriftliche Einwilligung

2.3 Studiendesign

Wir führten eine einfach verblindete, kontrollierte Studie über drei Untersuchungstage durch.

2.4 Ablauf im Einzelnen

Beim Screening der Patienten wurden durchgeführt:

- Anamnese
- Körperliche Untersuchung
- Laboruntersuchungen im nüchternen Zustand incl. kleinem Blutbild, CRP, Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Quick, INR, PTT, Blutzucker i.S., Gesamt-Cholesterin, HDL, LDL, Triglyceride, Harnstoff und Kreatinin
- Prüfen der Ein- und Ausschlusskriterien (siehe 2.2)
- Schriftliche und mündliche Aufklärung

Nach schriftlicher Aufklärung wurden die Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden gebeten, 48 Stunden vor Beginn der Untersuchung langwirksame Nitrate und Calciumantagonisten zu pausieren, um interferierende Effekte auf den Vasotonus auszuschließen. Die Raucher wurden gebeten, 24 Stunden vor Studienbeginn nicht zu rauchen. Zwischen den einzelnen Studientagen bestand ein Abstand von mindestens einer Woche. Die Untersuchungen fanden am frühen Nachmittag in einem klimatisierten Raum (22 - 24°C) im Liegen statt.

Die Untersuchung begann zunächst mit einer Ruhephase von mindestens einer halben Stunde in Rückenlage. Die Arme lagen dabei stets entspannt in Supinationsstellung neben dem Körper. Initial wurde der Blutdruck fünfmal in Folge mit einer Ruhepause von 5 Minuten zwischen 2 Messungen ermittelt, um aus diesen Daten später den Mittelwert zu berechnen. Danach begannen die Vorbereitungen für die Laser-Doppler-Messung (s.u.). Zunächst wurde der zuerst zu untersuchende Arm kompressionsfrei auf einem Vakuum-Kissen gelagert. Es wurden mit einer Kunststoffschaablone maximal fünf kreisrunde Areale auf jedem Unterarm markiert, in die später die Injektionen erfolgen sollten. Alle

Markierungen befanden sich ab 1 cm distal der Ellenbeuge bis maximal 8-10 cm proximal des Handgelenkes auf der Volarseite des Unterarms an möglichst wenig behaarter Stelle und zwischen den großen Venenverläufen. Die Zuordnung der zu injizierenden Substanzen erfolgte randomisiert.

2.5 Patienten

Wir rekrutierten die Patienten aus einer Herzsportgruppe in Essen, den kardiologischen Stationen des Universitätsklinikums Essen und durch eine Zeitungsanzeige in einem Essener Wochenblatt. Für die Teilnahme an der Studie wurde eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 40€ pro Untersuchungstag gezahlt.

Wir prüften 22 Patienten auf Ein- und Ausschlusskriterien. Zwei Patienten wurden aufgrund fehlender Einverständniserklärungen und ein Patient aufgrund eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen. Es wurden 19 Patienten in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten befanden sich im Ruhestand bzw. vorzeitigem Ruhestand. Die Kontrollgruppe bestand aus 20 gesunden Probanden. Tabelle 2 gibt die Basischarakteristika von Patienten und Kontrollen wieder (Tabelle 2, Seite 42).

Alle Patienten nahmen kreislaufwirksame Medikamente ein: Betablocker (n=18), ASS (n=16), ACE-Hemmer (n=8), Diuretika (n=4), Ca-Antagonisten (n=4), Nitrate (n= 4), HMG-Co-A-Reduktase-Inhibitoren (n=15) und Orale Antidiabetika (n=1). Die eigenen Medikamente sollten bis auf Nitrate und Calciumantagonisten (s.o.) wie gewohnt eingenommen werden. Die gesunden Probanden nahmen keine kreislaufwirksamen Substanzen ein.

2.6 Methoden

2.6.1 Verwendete Pharmaka und Prüfsubstanzen

1. Noradrenalin (Arterenol® Injektionslösung 1:1000; Höchst, Frankfurt, Deutschland),
2. NaCl 0,9% (Braun, Melsungen, Deutschland).
3. Nitroprussidnatrium (Nipruss® Trockensubstanz zu Infusionszwecken, Schwarz Pharma, Monheim, Deutschland).
4. Humanalbumin-Lösung 20% (hauseigenen Apotheke des Universitätsklinikums Essen, die Chargen wurden dokumentiert.
5. Endothelin (ET-1, Firma Clinalfa, Läfelfingen, Schweiz).
6. Endothelinantagonisten (BQ123 und BQ788, Firma Clinalfa, Läfelfingen, Schweiz).

Nitroprussid-Natrium wurde mit NaCl 0,9% auf eine Konzentration von 10^{-8} mol/0,01 ml verdünnt. Die Substanzen NA und ET-1 und wurden mit NaCl 0,9% zu Lösungen mit den Konzentrationen 10^{-12} , 10^{-14} , 10^{-16} mol/0,01 ml verdünnt. Der ET-1 Lösung wurde 5% Humanalbumin zugesetzt um eine Adsorption an die verwendeten Kunststoffmaterialien zu verhindern. Die ET-1-Antagonisten (BQ123 und BQ788) wurden mit NaCl 0,9% zu Lösungen mit den Konzentrationen 10^{-8} mol/ 0,01ml verdünnt.

2.6.2 BQ 123

BQ-123 ist ein selektiver ET_A -Rezeptorantagonist. Bei systemischer Anwendung führt die Infusion von BQ123 zu einem geringen Blutdruckabfall und einem reflektorischen Anstieg der Herzfrequenz.

Bei systemischer Anwendung sind als Nebenwirkungen Unterschenkelödeme, Schwindel, Flush, Ohrgeräusche und Leberwertanstiege beobachtet worden. Bei der von uns verwendeten Dosis und bei strenger intradermaler Injektion waren keine systemischen Wirkungen zu erwarten.

2.6.3 BQ 788

BQ-788 ist ein selektiver ET_B-Rezeptorantagonist. Diese Substanz ist therapeutisch nicht etabliert, wird aber seit mehr als 10 Jahren in der klinischen Forschung eingesetzt.

BQ-788 bei jungen gesunden Probanden zu einem Anstieg des peripheren Gefäßwiderstandes und einer reduzierten Herzfrequenz. Auf den Blutdruck hat es keinen Effekt (Strachan et al. 1999).

Bei der von uns verwendeten Dosis und der strengen intradermalen Injektion waren keine systemischen Wirkungen zu erwarten.

2.6.4 Nitroprussid-Natrium

Nitroprussid-Natrium (NPN) gilt als eine der stärksten blutdrucksenkenden Substanzen. Es führt über eine direkte Freisetzung von NO zu einer Dilatation im arteriellen sowie auch im venösen Gefäßsystem. Es wird ausschließlich auf Intensivstationen zur Senkung des peripheren Widerstandes bei akuten Hochdruckkrisen oder zur Behandlung der akuten Herzinsuffizienz eingesetzt. Seine Wirkung ist stark dosisabhängig und die Wirkdauer sehr kurz. Im Organismus wird NPN über die Zwischenstufen Cyanid und Thiocyanid abgebaut. Die HWZ der Substanz liegt bei ca. 10 Minuten.

Für die bei uns angewendete Dosis und bei strenger intradermaler Injektion waren keine systemischen Wirkungen zu erwarten.

2.6.5. Triple-Injektionstechnik

Um den Effekt von vasoaktiven Substanzen auf die Hautmikrozirkulation in vivo zu untersuchen, wandten wir die in unserem Labor entwickelte Triple-Injektionstechnik an. Diese Triple-Injektionstechnik ist eine technische Erweiterung der in unserem Labor entwickelten und validierten Doppelinjektionstechnik (Gössl et al. 2004). Man führt hierzu mit möglichst dünnen Nadeln (Omnican®, 0,4 mm Insulinnadeln) nacheinander drei Injektionen streng intradermal und über

denselben Stichkanal durch (Abbildung 3). Der Kontakt der Nadel mit der Haut wurde dabei so kurz wie möglich gehalten. Die Zweit- und Drittinjektion erfolgen in gleicher Ebene und Tiefe. Pro Injektion werden 0,01 ml der jeweiligen Substanz appliziert. Der Effekt einer solchen Triple-Injektion bleibt auf wenige Zentimeter der Haut beschränkt und verursacht beim Probanden manchmal ein kurzes Brennen während der Injektion. Die für die Injektionen erforderlichen Substanzmengen sind so gering, dass es zu keinerlei systemischer Wirkung kommt.

Durch die erste Injektion sollte eine Vasodilatation ausgelöst werden, durch die Effekte der Vasokonstriktoren, die nachfolgend injiziert werden, im Bereich der Injektionsquaddel messen zu können. In Vorversuchen zu unserer Arbeit kam es durch die Injektion von 0,01 ml NaCl 0,9% bei den Arteriosklerosepatienten zu keiner ausreichenden Vasodilatation der Hautgefäße. Wir führten daher eine Reihe weiterer Untersuchungen durch, in denen wir Patienten unterschiedliche Dosierungen NPN in die Hautgefäße injizierten und die daraus resultierende Vasodilatation verglichen. Dabei zeigte sich die Dosierung 10^{-8} mol pro Injektionsfeld optimal für die Vasodilatation der Hautgefäße (Ergebnisse nicht dargestellt).

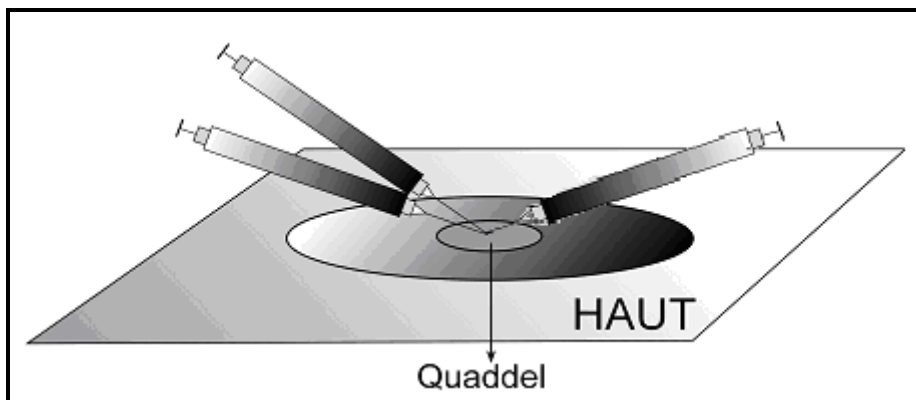


Abbildung 3: Schema der Triple-Injektionstechnik

Bei jedem Studienteilnehmer wurde zusätzlich pro Tag und Arm eine Kontrollquaddel (NPN 10^{-8} mol + NaCl 0,9% + NaCl 0,9%) gesetzt. Auf diese Weise wurden Begleiteffekte (des Volumens, des Injektionstraumas, des

Lösungsmittels und des Dilatators) erfasst. In die restlichen Injektionsfelder wurden 20 verschiedene Triple-Injektionen nach einem unten gezeigten Schema durchgeführt (Tabelle 1). Diese wurden auf beide Arme und die drei Untersuchungstage verteilt. War die Injektion nicht im selben Stichkanal erfolgt wurde die Quaddel von der Auswertung ausgeschlossen.

Erste Injektion	Zweite Injektion	Dritte Injektion
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	NaCl (0,9%)	NaCl(0,9%)
BQ123 (10^{-8} mol/0,01ml)	NaCl (0,9%)	NaCl (0,9%)
BQ788 (10^{-8} mol/0,01ml)	NaCl (0,9%)	NaCl (0,9%)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	ET-1 (10^{-12} mol/0,01ml)	NaCl (0,9%)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	ET-1 (10^{-14} mol/0,01ml)	NaCl (0,9%)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	ET-1 (10^{-16} mol/0,01ml)	NaCl (0,9%)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ123 (10^{-8} mol/0,01ml)	ET-1 (10^{-12} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ123 (10^{-8} mol/0,01ml)	ET-1 (10^{-14} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ123 (10^{-8} mol/0,01ml)	ET-1 (10^{-16} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ788 (10^{-8} mol/0,01ml)	ET-1 (10^{-12} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ788 (10^{-8} mol/0,01ml)	ET-1 (10^{-14} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ788 (10^{-8} mol/0,01ml)	ET-1 (10^{-16} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	NA (10^{-12} mol/0,01ml)	NaCl (0,9%)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	NA (10^{-14} mol/0,01ml)	NaCl (0,9%)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	NA (10^{-16} mol/0,01ml)	NaCl (0,9%)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ123 (10^{-8} mol/0,01ml)	NA (10^{-12} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ123 (10^{-8} mol/0,01ml)	NA (10^{-14} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ123 (10^{-8} mol/0,01ml)	NA (10^{-16} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ788 (10^{-8} mol/0,01ml)	NA (10^{-12} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ788 (10^{-8} mol/0,01ml)	NA (10^{-14} mol/0,01ml)
NPN (10^{-8} mol/0,01ml)	BQ788 (10^{-8} mol/0,01ml)	NA (10^{-16} mol/0,01ml)

Tabelle 1: Unterschiedliche injizierte Substanzkombinationen (pro Injektion 0,01ml).

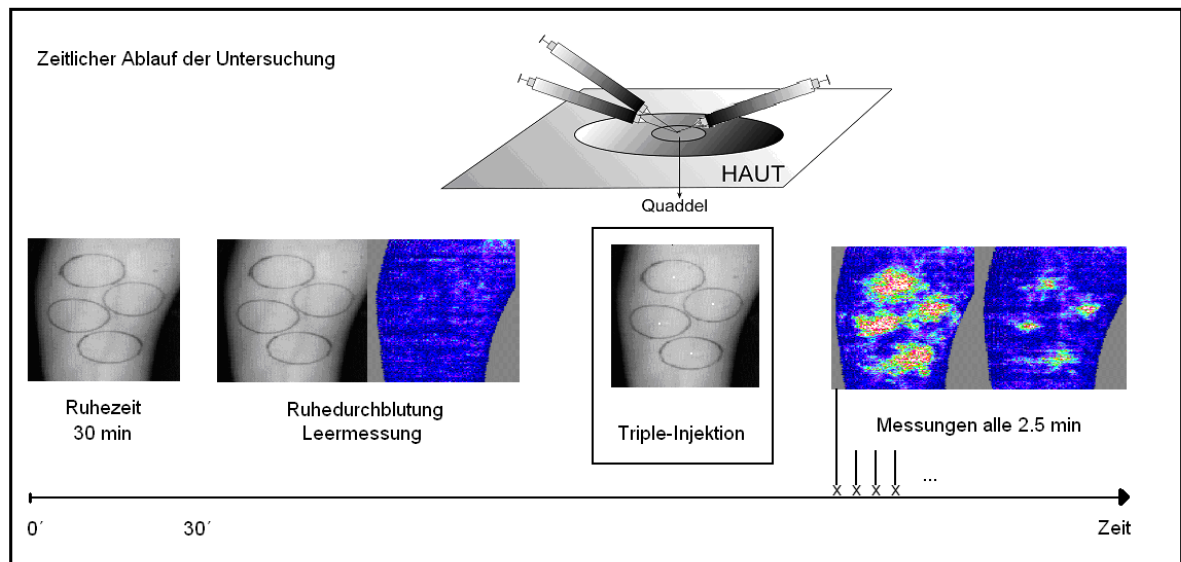


Abbildung 4: Injektionsschema der einzelnen Quaddeln und zeitlicher Ablauf

2.6.6 Laser-Doppler-Flussmessung

Die Laser-Doppler-Flussmessung ist ein etabliertes Verfahren, welches erstmals von Stern und Mitarbeitern zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit im Gewebe benutzt wurde (Stern et al. 1975). Mittlerweile findet dieses Verfahren in vielen medizinischen Disziplinen zur Messung der Gewebe-Perfusion Anwendung. Die Laser-Doppler-Flussmessung erlaubt es, die Mikrozirkulation in einem sehr kleinen Gewebebereich von etwa 1 mm Dicke zu untersuchen. Dabei können in erster Linie Änderungen der Durchblutung erfasst werden, wobei eine arbiträre Einheit (sogenannte "Perfusion Units", abgekürzt PU) verwendet wird.

Das Prinzip beruht auf dem optischen Doppler-Effekt, demzufolge die Frequenz einer elektromagnetischen Welle, die von einem bewegten Objekt reflektiert wird, um einen bestimmten Betrag gegenüber der Frequenz des ursprünglichen Lichtes, verschoben ist. Hierbei wurde das Laserlicht zunächst noch über Glasfasern vom Laser zum Messpunkt und wieder zurück zum Detektor geleitet. Es war dabei ein direkter Kontakt der Messsonde mit dem zu untersuchenden Gewebe nötig. Nachteil dieser Methode war, dass die jeweilige Messung durch den Anpressdruck des Lichtleiters durch den Untersucher beeinflusst werden konnte (Nilsson et al. 1980, Niazi et al. 1993). Außerdem konnte nur ein sehr

kleines Gewebe-Areal von ca. $1,2 \text{ mm}^2$ pro Messung erfasst werden. Eine Weiterentwicklung dieses Prinzips stellt der für unsere Messungen verwendete Laser-Doppler Imager Moor LDI 3,01 Scanner (Moor Instruments Ltd., Axminster, Devon, UK) dar. Er erlaubt die berührungsfreie Untersuchung größerer Areale.

2.6.7 Das Prinzip des Laser-Doppler Scanner Moor LDI 3.01

Das Licht eines Helium-Neon-Lasers mit einer Wellenlänge von 632,8 nm und einer maximalen Leistung von 2 mW wird über einen computergesteuerten beweglichen Spiegel mäanderförmig über das auszumessende Hautareal gelenkt. Es sind Algorithmen zur geometrischen Korrektur implementiert, um sicherzustellen, dass alle Aufzeichnungen unverzerrt bleiben. Abhängig von der Konzentration und Geschwindigkeit der oberflächennahen Erythrozyten ist das Laserlicht nicht mehr monochromatisch, sondern durch Dopplerverschiebung ein Frequenz-Gemisch. Aus dem Leistungsspektrum des von dem Detektor erfassten Lichtes wird ein Wert für die Mikrozirkulation berechnet. Dabei ordnet die Software des Systems jedem Bildpunkt einen Messwert zu. Die Linearität des Signals konnte mit Flusssimulationsmessungen bestätigt werden. Des Weiteren konnte in einem Vergleich mit herkömmlichen Laser-Dopplern gezeigt werden, dass der LDS der räumlichen und zeitlichen Inhomogenität der Hautdurchblutung in besonderem Maße Rechnung trägt (Niazi et al. 1993, Pape et al. 2001). So gibt es Hautareale mit geringeren Fluxwerten und Hautareale mit höheren Fluxwerten. Auch nach Perfusionssteigerung ändert sich dieses grundlegende Perfusionsmuster nicht. Aus den empfangenen Daten werden die Werte Flux (proportional dem Blutfluss) und Conc (Proportional der Konzentration bewegter Blutkörperchen) berechnet. Aufgrund der Natur des Blutflusses in Kapillaren und der Variabilität der Hautpigmentierung und -Struktur des Menschen ist eine Angabe in absoluten Durchflusseinheiten, wie etwa ml/100g/min nicht sinnvoll. Daher erfolgt die Angabe in standardisierten Einheiten. Standardisiert wird die Einheit „RU“ (Relative Unit) verwendet, die den vollen Dynamikbereich des LDS während der Messung ausnutzt. Aus diesen Werten wird abhängig von der Gerätekonfiguration wie z.B. Verstärkung und Objektabstand die Einheit „PU“ (Perfusion Unit) errechnet, die den Vergleich zwischen Messungen unterschiedlicher Konfiguration ermöglicht. Synchron zur Bewegung des

Laserstrahls wird im Rechner ein Bild des abgetasteten Areals aufgebaut. Abhängig von der gewählten Grundeinstellung wird z.B. alle 4 ms ein Messwert ermittelt und dem entsprechenden Pixel des Bildes als Falschfarbenwert zugeordnet. Am Ende eines Messvorganges erhält man somit ein farbcodiertes Abbild der Mikrozirkulation des gesamten Scan-Bereiches (Abbildung 4). Mit Hilfe des LDS lassen sich ein- und zweidimensionale Parameter bestimmen. Während einer Messung können primär die absoluten Fluxwerte im Messareal, der Perfusionsmittelwert und das Perfusionsmaximum bestimmt werden.

Mit Hilfe eines zusätzlichen Auswertungsprogramms kann die Fläche eines definierten Messareals (z.B. der jeweilig zu untersuchenden Hautquaddel) in Anzahl der Pixel, des mittleren Flux mit dessen Standardabweichung, sowie der maximale Flux der jeweiligen Einzelaufnahmen bestimmt werden. Dies ermöglicht die genaue Erfassung der Perfusionsänderung in der jeweiligen Hautquaddel im jeweils gemessenen Zeitraum.

In unserer Studie betrug die Messzeit 4 ms/Pixel, so dass ein Hautareal von 60 cm² Größe in 2 min gemessen werden konnte. Der Blutfluss wurde nach dem Anzeichnen der Injektionsfelder und vor Beginn der Injektionen als Leermessung festgehalten. Nach der Triple-Injektion erfolgte eine Serienaufnahme von 12 Messungen mit jeweils 30 Sekunden Pause zwischen den Einzelmessungen. Eine Serienaufnahme dauerte somit 27 Minuten.

2.6.8 Blutdruck und Herzfrequenzmessung

Der Blutdruck und die Herzfrequenz wurden am Oberarm oszillometrisch mit dem Blutdruckmessgerät „DINAMAP™“ (Firma „CRITIKON Ltd“, Norderstedt, Deutschland) gemessen.

2.6.9 Ermittlung der Fluxwerte und Datenverarbeitung

Die Aufnahmen der Ruhedurchblutung und die anschließende Serienaufnahme nach Injektion wurden getrennt voneinander ausgewertet. Zur Ermittlung der

Fluxwerte wurde mit Hilfe des Auswertungsprogramms des LDS eine „region of interest“ positioniert (ROI). Deren Fläche betrug für alle Messungen $2,5 \text{ cm}^2$. Zur Auswertung der ET-1 Injektionen wurden aufgrund der bekannten Heterogenität der Quaddeln (periphere Vasodilatation bei ausgeprägter zentraler Vasokonstriktion) eine kleinere zentral gelegene ROI von $0,3 \text{ cm}^2$ festgelegt. Diese Größe erwies sich bei den verwendeten Substanzen im Hinblick auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und Untersucherabhängigkeit als die beste Lösung. Das Auswertungsprogramm des LDS gestattet die gleichzeitige Bildschirmdarstellung des Falschfarbenbildes der Ruhedurchblutung sowie die Darstellung der Serienaufnahme. Es ist somit möglich die ROI in beiden Bildern gleich zu positionieren. Die Moor-Software berechnet anschließend getrennt für die Ruhedurchblutung und jedes einzelne Bild der Serienmessung die mittlere Flux der ROI und speichert diese Textdatei ab. In nur wenigen Fällen, wenn sich der Patient zwischen zwei Messungen bewegt hatte, war eine Korrektur der Position der ROI in den einzelnen Bildern einer Serienaufnahme nötig. Aus den so entstandenen Textfiles wurden dann die jeweiligen Fluxwerte in das Programm Excel (Microsoft® Office Paket) übertragen. Hier erfolgten die weiteren Berechnungen. Zunächst wurden die Fluxwerte der Ruhedurchblutung der jeweiligen Quaddel subtrahiert. In einem zweiten Rechenschritt wurde dann die durch NPN ausgelöste Perfusionssteigerung von den einzelnen Quaddeln subtrahiert. So konnte der „Netto“-Effekt der jeweils injizierten Substanz auf die Mikrozirkulation berechnet werden.

2.7 Statistische Auswertung

Analysiert wurden die:

- 1) Ruhedurchblutung
- 2) NPN- induzierte Vasodilatation
- 3) Wirkung von BQ123 und BQ788 auf die Mikrozirkulation
- 4) Durch ET-1 und NA ausgelöste Vasokonstriktion
- 5) Wirkung von BQ788 und BQ123 auf die ET-1 und NA induzierte Vasokonstriktion
- 6) Hämodynamischen Parameter (systolischer und diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz)

Die Dosis-Wirkungskurven wurden mittels Varianzanalyse mit den Faktoren Medikament und Dosis (des jeweiligen Vasokonstriktors) verglichen. Wir verwendeten GraphPrism4® MS Windows (GraphPad software INC., San Diego CA. U.S.A). Für die Analyse von Einzelparametern der anthropometrischen Daten wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet.

Ein p-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Wenn nicht anders angegeben, sind alle Werte als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Ruheperfusion

Die Ruhedurchblutung der Haut, gemessen vor Beginn der Injektionen, unterschied sich bei den Patienten und den Kontrollpersonen an den einzelnen Untersuchungstagen nicht signifikant ($p > 0,5$; Abbildungen 5-6).

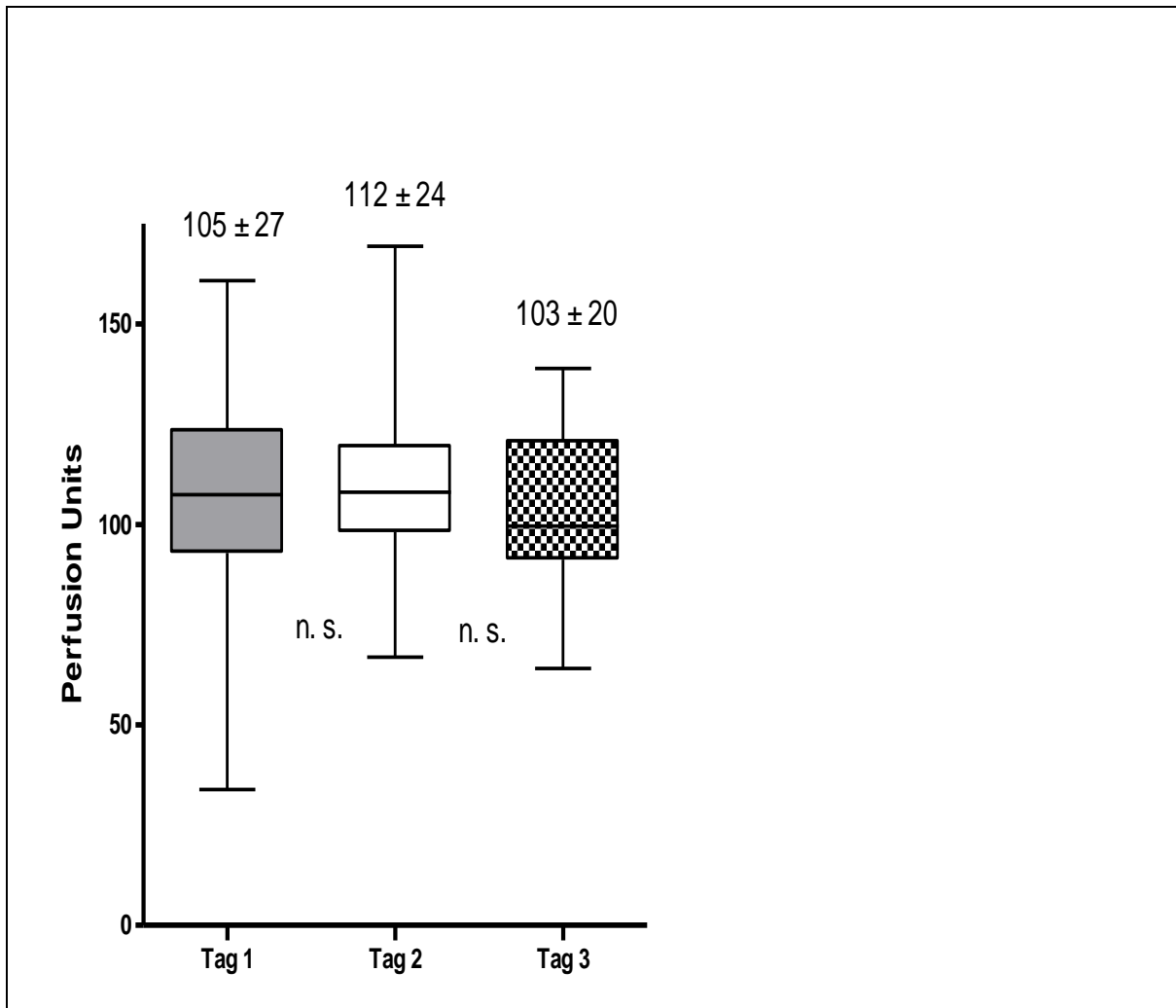


Abbildung 5: Ruheperfusion bei Patienten an den drei Untersuchungstagen (Mittelwerte \pm SD; n.s. = nicht signifikanter Unterschied).

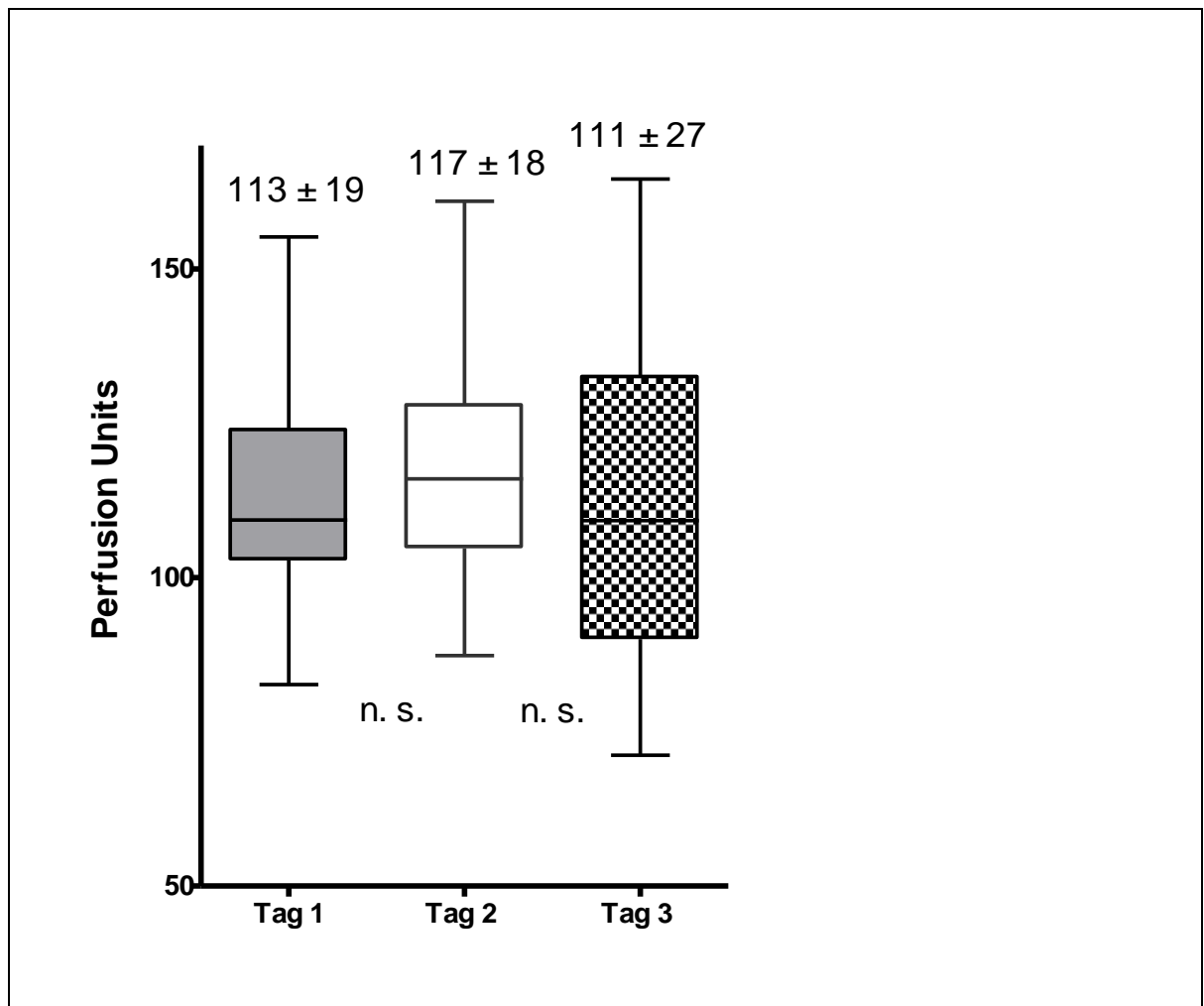


Abbildung 6: Ruheperfusion der Kontrollgruppe an den drei Untersuchungstagen (Mittelwerte \pm SD; n.s. = nicht signifikanter Unterschied).

Die mittlere Ruheperfusion von Patienten und Kontrollen vor Beginn der Injektionen unterschied sich ebenfalls nicht signifikant (Patienten vs. Kontrolle, $p > 0,05$; Abbildung 7).

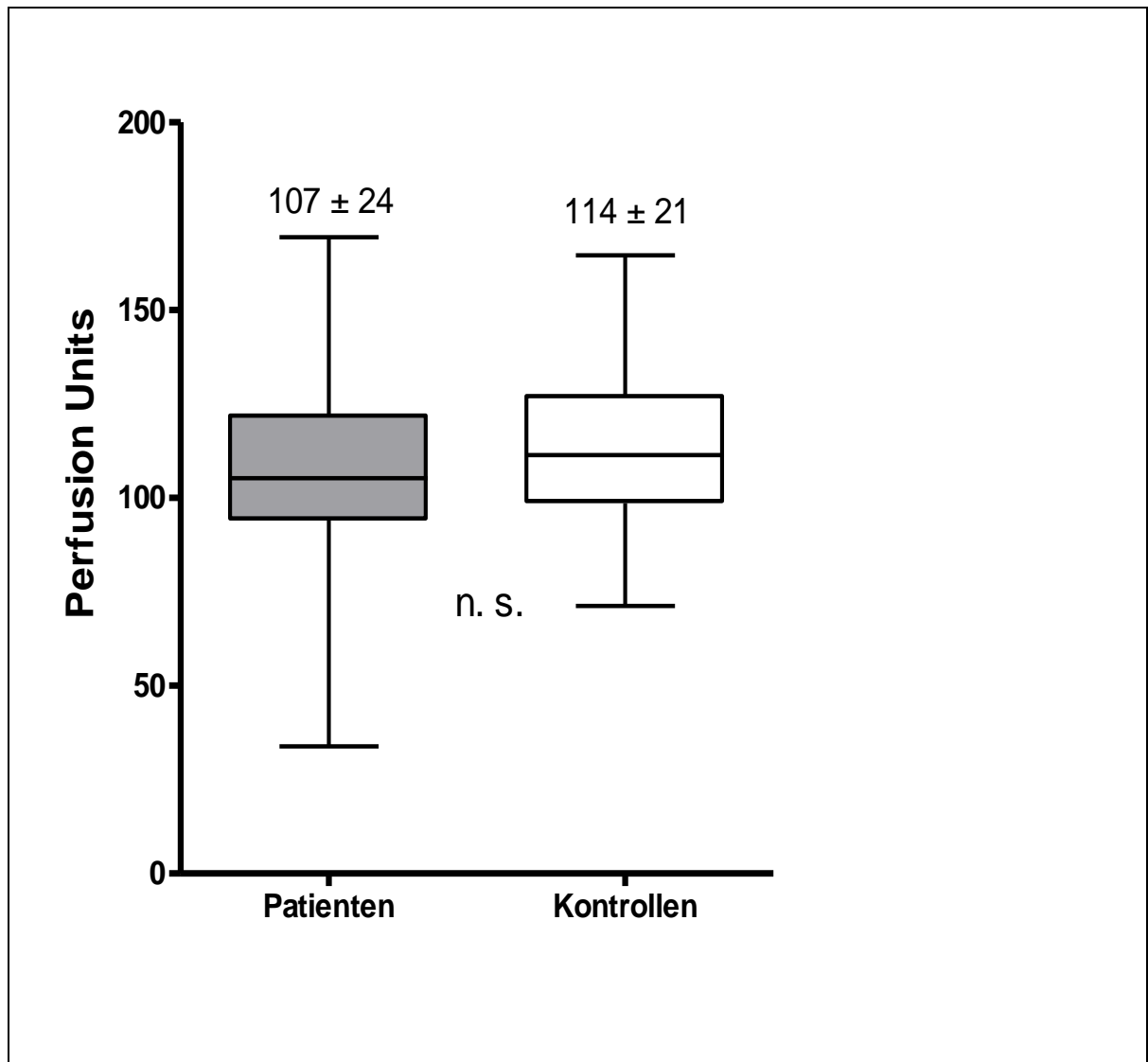


Abbildung 7: Mittlere Ruheperfusion von Patienten und Kontrollen an allen drei Untersuchungstagen (Mittelwerte \pm SD; n.s. = nicht signifikanter Unterschied).

3.2 Wirkung von ET-1 alleine und Kombination mit den selektiven ET-Antagonisten

Nach Injektion von ET-1 kam es in beiden Untersuchungsgruppen in allen verabreichten Dosierungen zu einer Vasokonstriktion. Diese fiel in den Dosierungen 10^{-12} mol und 10^{-16} mol in der Patientengruppe signifikant stärker aus, als in der Kontrollgruppe ($p < 0,01$, Abbildung 8). In der Dosierung 10^{-14} mol unterschied sich die Vasokonstriktion in der Patientengruppe nicht signifikant von der Kontrollgruppe ($p > 0,5$; Abbildung 8). Bei den Patienten verhielt sich die Perfusionsabnahme nicht linear dosisabhängig, wohingegen in der Kontrollgruppe eine linear dosisabhängige Wirkung vorlag (Abbildung 8).

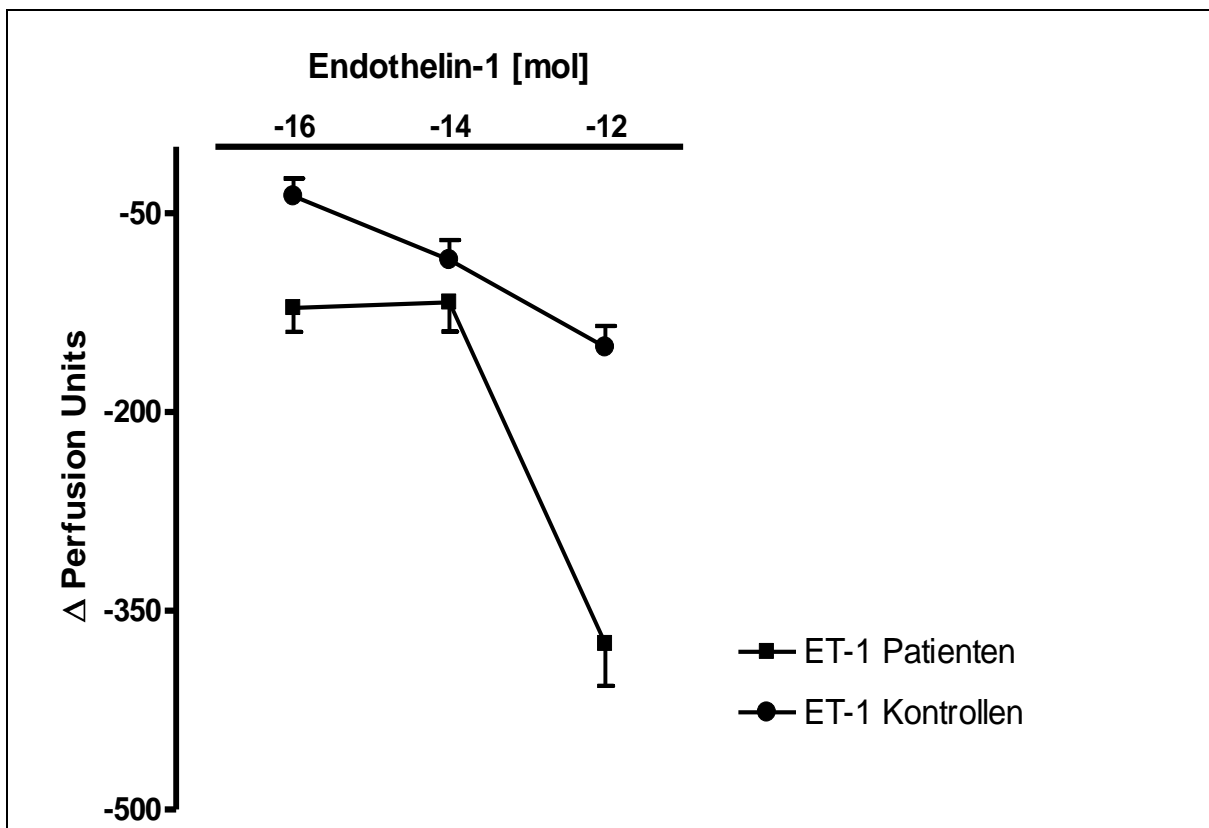


Abbildung 8: ET-1- induzierte Vasokonstriktion bei Patienten und Kontrollen in drei unterschiedlichen Dosierungen.

Der selektive ET_A-Antagonist BQ123 reduzierte die durch ET-1 induzierte Vasokonstriktion in beiden Untersuchungsgruppen signifikant ($p < 0,001$; Abbildung 9).

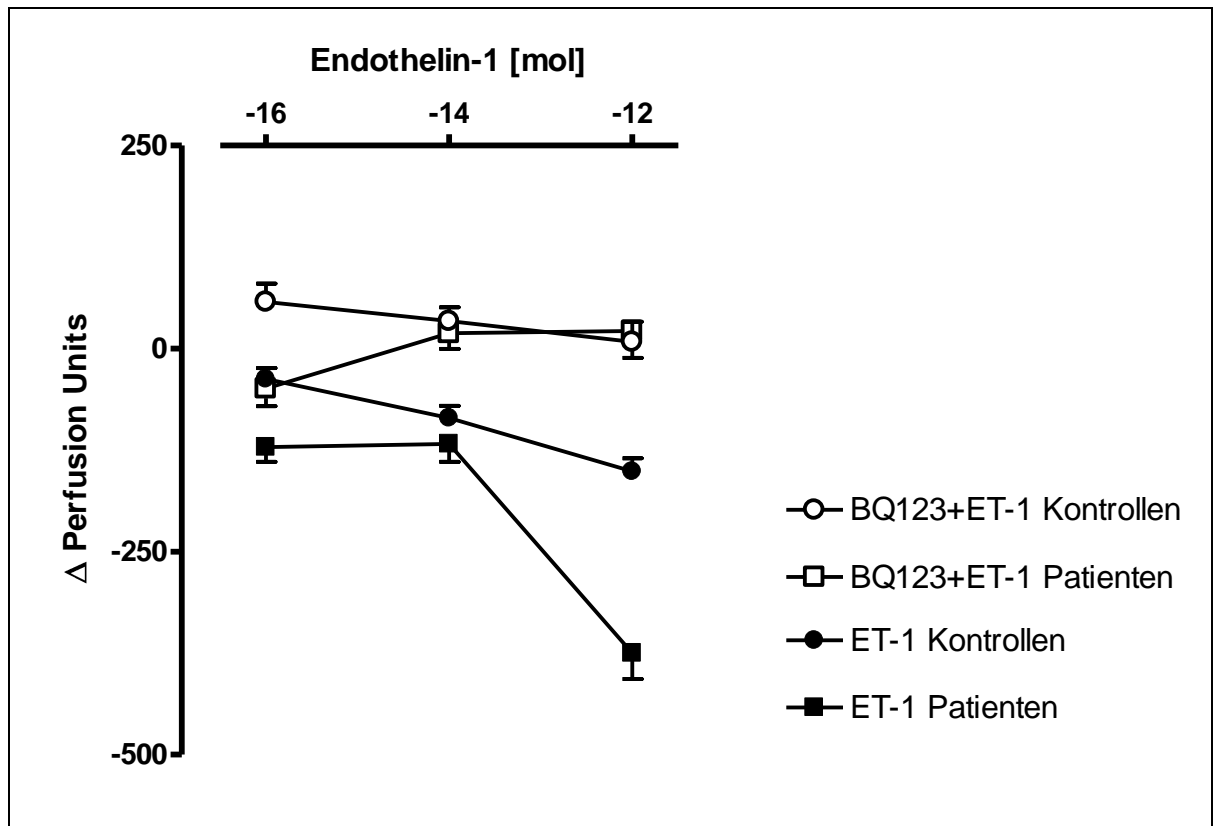


Abbildung 9: Wirkung des ET_A-Antagonisten BQ123 auf die ET-1- induzierte Vasokonstriktion bei Patienten und Kontrollen in drei unterschiedlichen Dosierungen .

Der selektive ET_B-Antagonist BQ788 reduzierte die durch ET-1 induzierte Vasokonstriktion in der Patientengruppe signifikant ($p < 0,01$; Abbildung 10). In der Kontrollgruppe hatte BQ788 keinen Einfluss auf die Vasokonstriktion ($p > 0,5$; Abbildung 10)

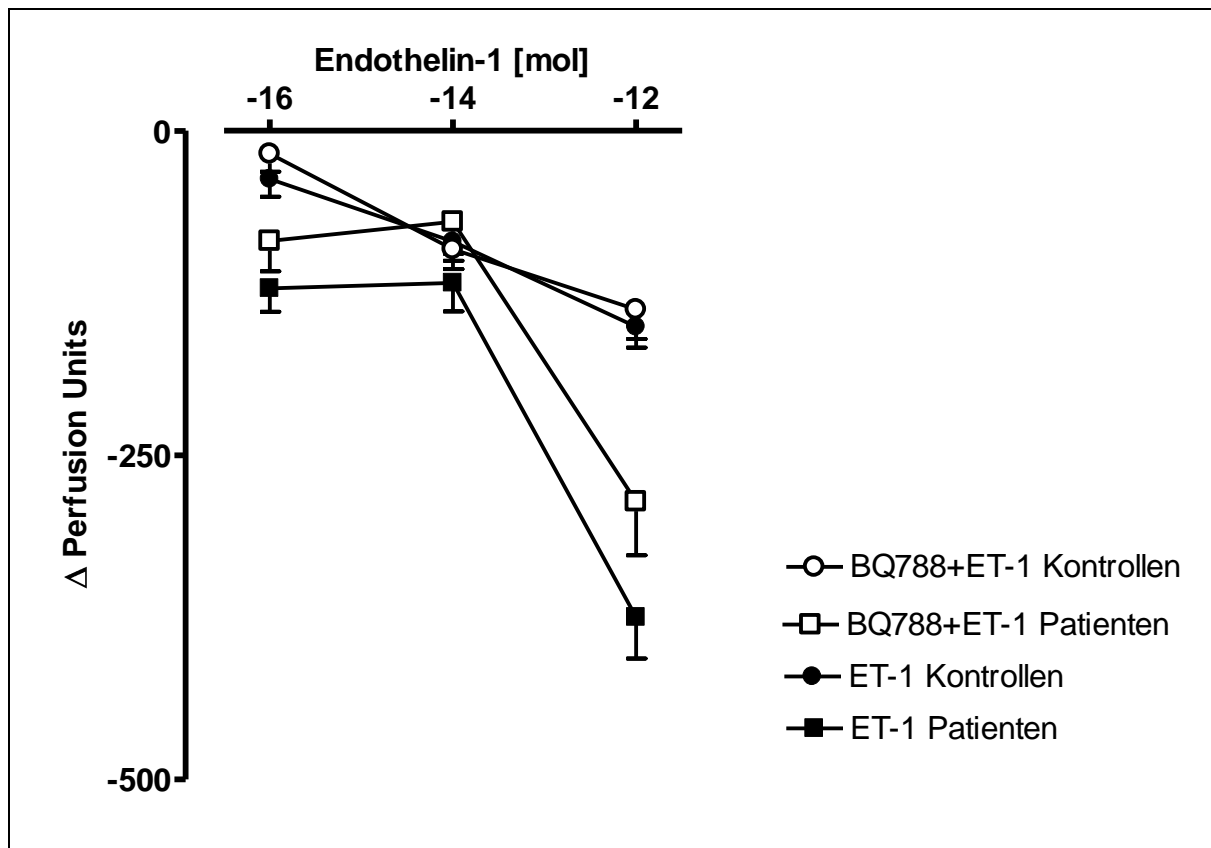


Abbildung 10: Wirkung des ET_B-Antagonisten BQ788 auf die ET-1- induzierte Vasokonstriktion bei Patienten und Kontrollen in drei unterschiedlichen Dosierungen.

3.3 Wirkung von NA alleine und in Kombination mit den selektiven ET-Antagonisten

Nach Injektion von NA kam es in beiden Untersuchungsgruppen zu einer Vasokonstriktion. Dies war in der Dosierung 10^{-12} mol und 10^{-14} mol in der Gruppe der Patienten signifikant geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe ($p < 0,01$). In der Dosierung 10^{-16} mol bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p > 0,5$; Abbildung 11). Bei den Patienten verhielt sich die Vasokonstriktion nicht linear dosisabhängig, wohingegen in der Kontrollgruppe eine linear dosisabhängige Wirkung vorlag (Abbildung 11).

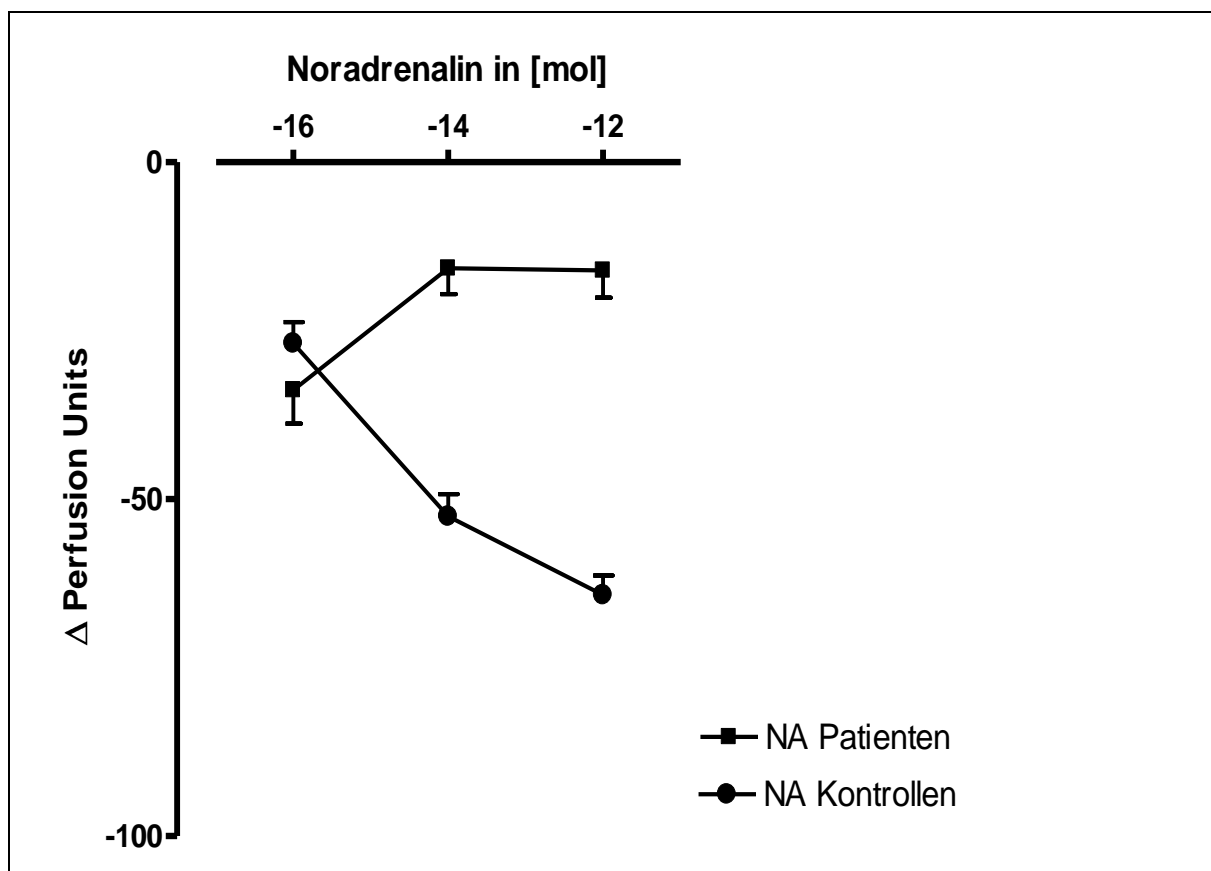


Abbildung 11: NA- induzierte Vasokonstriktion bei Patienten und Kontrollen in drei unterschiedlichen Dosierungen.

Der ET_A-Antagonist BQ123 reduzierte die durch NA induzierte Vasokonstriktion in der Gruppe der Patienten für die Dosierungen 10⁻¹⁶ mol und 10⁻¹⁴ mol signifikant ($p < 0,05$; Abbildung 12). Für die Dosierung 10⁻¹² mol konnte in der Patientengruppe keine Reduktion der Vasokonstriktion erreicht werden. Bei den Kontrollen wurde die NA- induzierte Vasokonstriktion für alle Dosierungen durch die Gabe von BQ123 signifikant reduziert ($p < 0,05$; Abbildung 12).

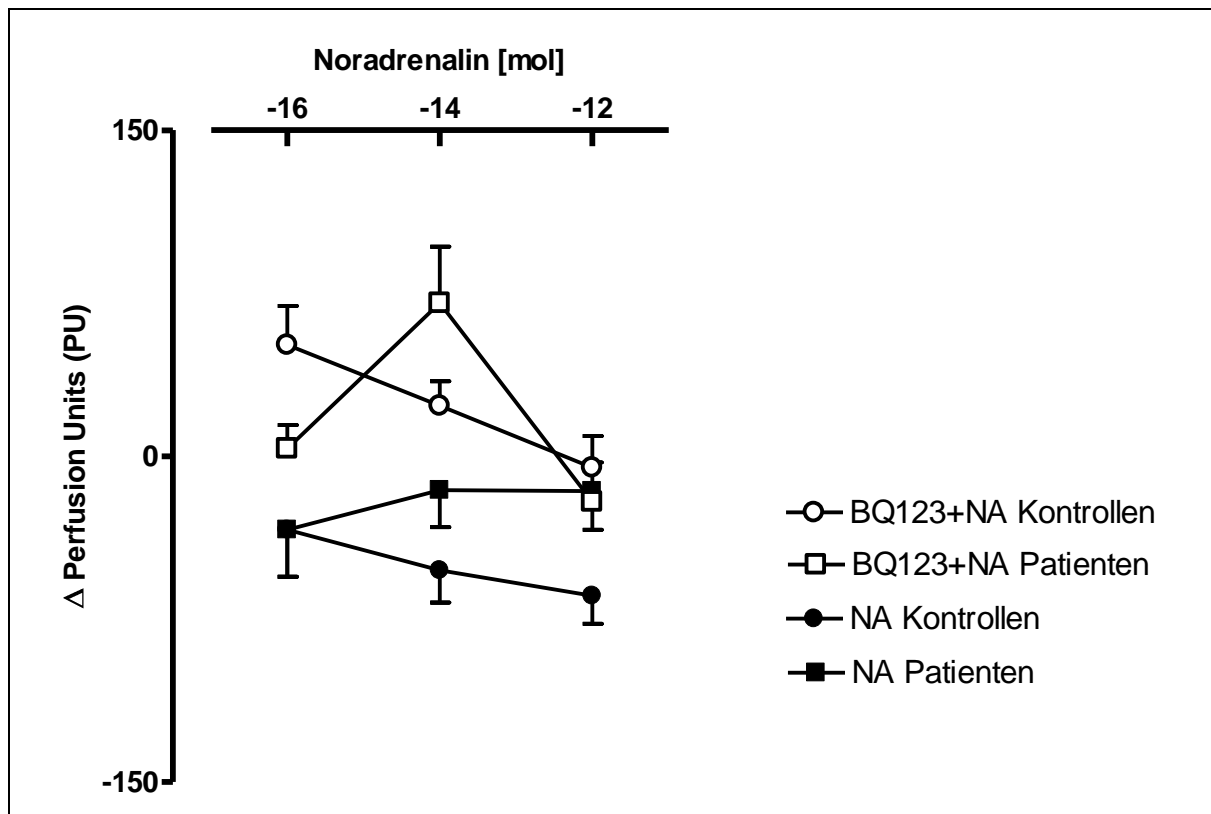


Abbildung 12: Wirkung des ET_A-Antagonisten BQ123 auf die NA- induzierte Vasokonstriktion bei Patienten und Kontrollen in drei unterschiedlichen Dosierungen.

Der ET_B-Antagonist BQ788 reduzierte die durch NA induzierte Vasokonstriktion in den Hautgefäßen bei den Patienten signifikant ($p < 0,001$; Abbildung 13). In der Kontrollgruppe hatte der selektive ET_B-Antagonist BQ788 keinen Einfluss auf die durch NA- induzierte Vasokonstriktion (Abbildung 13).

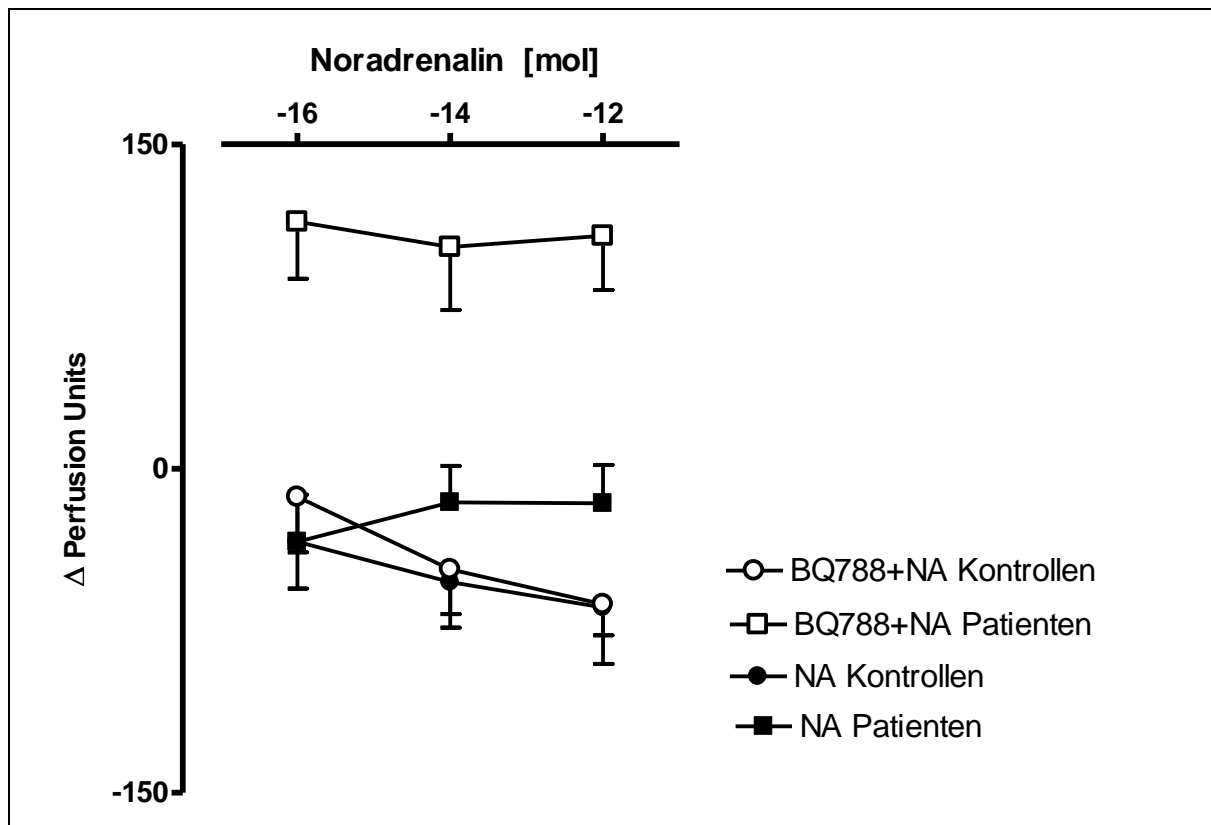


Abbildung 13: Wirkung des ET_B-Antagonisten BQ788 auf die durch NA- induzierte Vasokonstriktion bei Patienten und Kontrollen in drei unterschiedlichen Dosierungen.

3.4 Wirkung von BQ123 und BQ788

3.4.1 BQ123

Nach Injektion des selektiven ET_A -Antagonisten BQ123 [10^{-8} mol] kam es in beiden Untersuchungsgruppen zu einer Vasodilatation. Diese war in der Patientengruppe signifikant geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$; Abbildung 14).

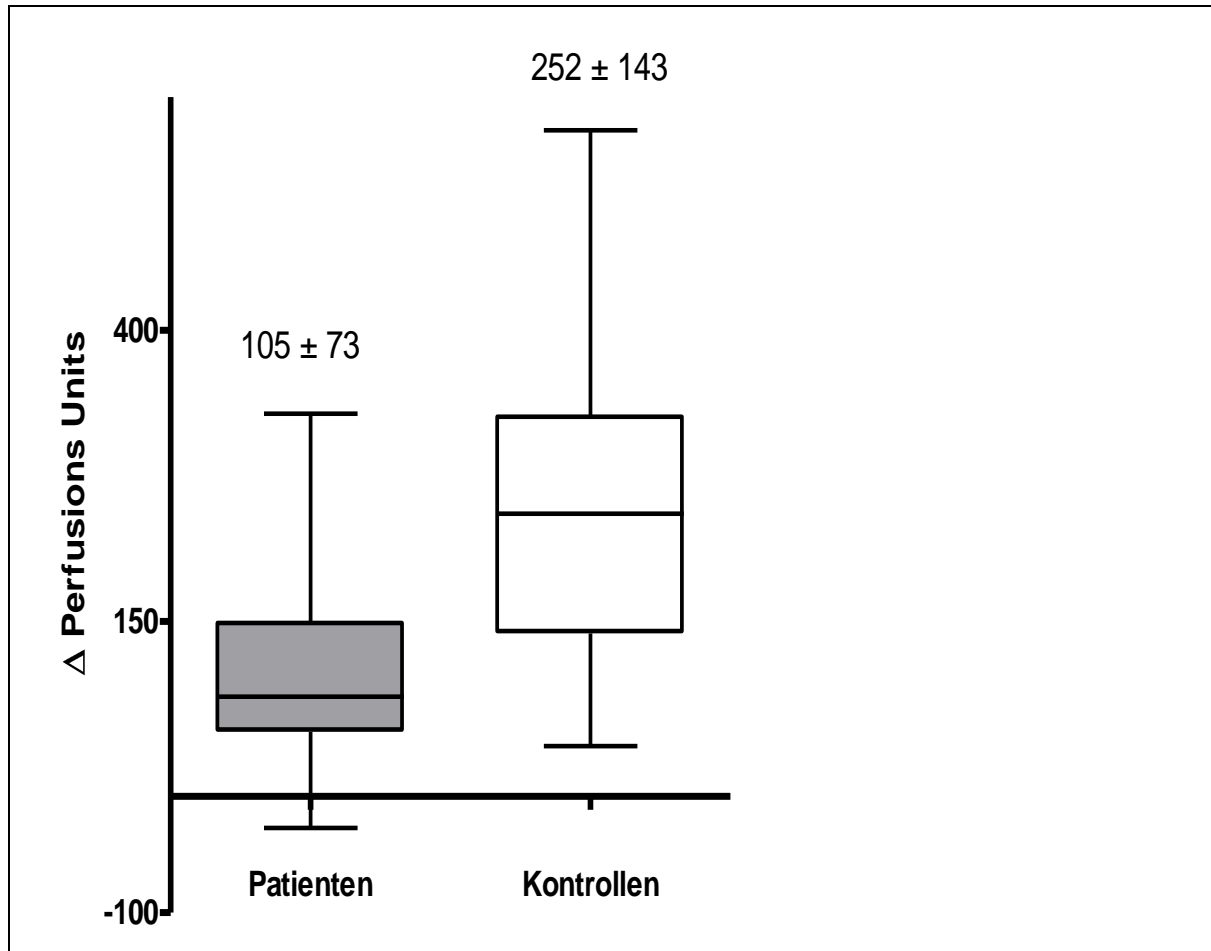


Abbildung 14: Mittlere BQ123 [10^{-8} mol] induzierte Perfusionsänderung bei Patienten und Kontrollen (Mittelwerte \pm SD; $p < 0,001$).

3.4.2 BQ 788

Nach Injektion des selektiven ET_B - Antagonisten BQ788 [10^{-8} mol] kam es bei den Patienten im Gegensatz zu den Kontrollen zu einer signifikanten Vasodilatation ($p < 0,001$; Abbildung 15)

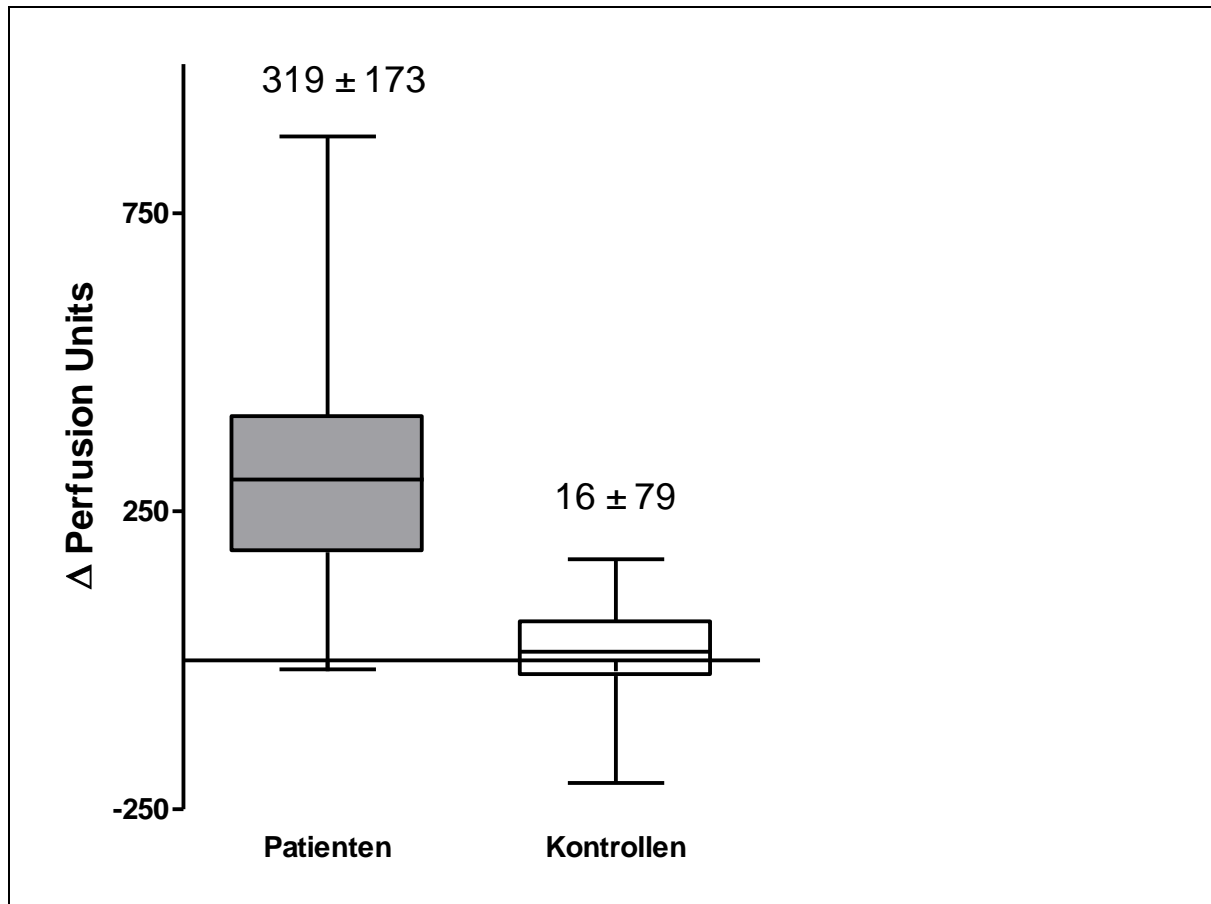


Abbildung 15: Mittlere BQ788 [10^{-8} mol] induzierte Perfusionsänderung bei Patienten und Kontrollen (Mittelwerte \pm SD; $p < 0,001$).

4 Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zu den möglicherweise unterschiedlichen Wirkungen der Transmitter ET-1 und NA in der Mikrozirkulation bei Patienten mit Arteriosklerose im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Primäre Hypothese unserer Arbeit war, dass sich Patienten und Kontrollen aufgrund der Endotheldysfunktion bei Arteriosklerose hinsichtlich der Rolle der ET_A- und ET_B- Rezeptoren bei der ET-1-vermittelten Vasokonstriktion unterscheiden.

Durch die Injektion von NA in Kombination mit den Endothelinantagonisten wollten wir eine mögliche Wechselwirkung zwischen den Transmittern des Sympathischen Nervensystems und dem Endothelinsystem zeigen und auch hier mögliche Unterschiede in der Bedeutung der Endothelinrezeptoren identifizieren.

4.1 Bemerkungen zur Methodik

Die Methode der hier vorliegenden Studie ist in abgewandelter Form (Doppelinjektionstechnik) in unserem Labor durch Vorarbeiten validiert (Wenzel et al. 2001, Wenzel et al. 1997, Mitchell et al. 2006). Wir verwendeten in Anlehnung an diese Arbeiten in unserer Studie die Erweiterung mittels Triple-Injektionstechnik. Diese wurde bereits in vorgängigen Studien in unserem Labor verwendet (Gössl et al. 2004). Die Technik erlaubt es, die Wirkung äußerst niedrig dosierter Substanzen auf die menschliche Hautmikrozirkulation in „vivo“ zu testen, ohne systemische Effekte zu verursachen (Opazo et al. 2005). Es können auf diese Weise mögliche gegenregulatorische Effekte ausgeklammert werden und somit reine Effekte der Substanzen auch bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen untersucht werden. Ausserdem ist es so möglich, Agonisten in Anwesenheit ihrer selektiven Antagonisten in-vivo zu untersuchen (Wenzel et al. 2001).

Zur Messung der Mikrozirkulationsänderungen der Haut verwendeten wir denselben Laser-Doppler-Imager (Moor LDI 3,01, Moor Instruments Ltd., Axminster, Devon, UK) wie in den Studien zur Doppelinjektionstechnik. Diese Messmethode ist als geeignete Methode zur Messung der Hautmikrozirkulation in

Vorarbeiten validiert (Opazo et al. 2005). Für diese Messungen konnten wir im Vorfeld eine hohe interindividuelle Reliabilität nachweisen mit einem Reliabilitätskoeffizienten grösser als 90% (Opazo et al. 2005).

Messungen der Hautdurchblutung mittels Laser-Doppler wurden früher vorwiegend mit dem punktuellen Laser-Doppler-Fluxmeter (LDF) durchgeführt. Durch die Weiterentwicklung zum Laser-Doppler-Imager konnte die Reproduzierbarkeit der Messungen deutlich verbessert werden. Ein weiterer Vorteil des neueren hochauflösenden LDI gegenüber seinem Vorgänger liegt vor allem darin, dass bei dieser Methode ein größeres Areal der Haut erfasst werden kann. Zudem ist kein direkter Hautkontakt mehr nötig und die Messung erfolgt kontinuierlich über einen determinierten Zeitraum. Weitere Vorteile der Methode sind die geringe Invasivität, der relativ geringe Zeitaufwand und die anwenderfreundliche Bedienung.

4.2 Bemerkungen zum untersuchten Kollektiv

Das Alter der Patienten lag im Durchschnitt etwas höher als das der gesunden Kontrollgruppe. Krankheitsbezogene Parameter wie BMI, Kreatinin, Cholesterin und Triglyzeride waren aufgrund der Gruppenbildung Patienten versus gesunde Kontrollen ungleich verteilt.

Die Mehrzahl der Patienten wurde mit Cholesterinsenkenden Medikamenten behandelt, so dass deren Cholesterinwerte signifikant erniedrigt waren im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. Besonders deutlich war der Unterschied bei den Triglyzeridwerten, hier bestand ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Patienten und Probanden ($p < 0,001$, Tabelle 2).

Charakteristika / Parameter	Patienten	Gesunde Kontrollen	p
N	19	20	n.s.
Alter [Jahre \pm SD]	61 \pm 9	55 \pm 7	0,03
Geschlecht			
- Männlich	15 (78,9%)	13 (65%)	
- Weiblich	4 (21,1%)	7 (35%)	
Nikotinkonsum			
- Raucher	7 (36,8%)	8 (40%)	
- Nichtraucher	12 (63,2%)	12 (60%)	
BMI [kg/m² \pmSD]	30,8 \pm 5,2	26,4 \pm 3,7	<0,01
Vitalparameter			
- RR syst./diastol. [mmHg \pm SD]	126 \pm 12 / 68 \pm 8	127 \pm 16 / 72 \pm 10	n.s.
- Herzfrequenz [min ⁻¹ \pm SD]	67 \pm 8	66 \pm 7	n.s.
Laborparameter [mg/dl \pm SD]			
- Blutzucker i.S.	119 \pm 14	93 \pm 17	n.s.
- Kreatinin i.S. [mg/dl \pm SD]	1,4 \pm 0,1	1 \pm 0,14	<0,01
- Cholesterin [mg/dl \pm SD]	169 \pm 47	203 \pm 27	<0,01
- HDL [mg/dl \pm SD]	57 \pm 20	59 \pm 17	n.s.
- LDL [mg/dl \pm SD]	101 \pm 32	137 \pm 21	<0,001
- Triglyzeride [mg/dl \pm SD]	196 \pm 23	116 \pm 9	<0,01
Diagnosen [n,%]			
- KHK	15 (78,9%)	-	
- Ischämischer Schlaganfall	1 (5,3%)	-	
- pAVK	1 (5,3%)	-	
- Arteriosklerose *	2 (10,5%)	-	

Tabelle 2: Demographische Daten, Vitalparameter und Laborparameter von Patienten und gesunden Kontrollen angegeben als Mittelwert \pm SD. *Duplexsonographisch nachgewiesen; BMI: Body-mass-index; HDL: High density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; RR: Blutdruck; KHK: Koronare Herzkrankheit; pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit; p: Signifikanzniveau.

4.3 Bemerkungen zum Endothelinsystem in der Entstehung der Arteriosklerose

Das Endothelinsystem ist nicht nur in viele physiologische, sondern auch in eine Reihe pathologischer Prozesse eingebunden. Bereits kurz nach der Entdeckung wurde eine Beteiligung von ET-1 bei der Entstehung einer Arteriosklerose sowie fibrosierenden Erkrankungen wie Lungenfibrose, pulmonal arterieller Hypertonie und Sklerodermie postuliert (Böhm et al. 2007, Dupuis et al. 2008). Chester et al. wiesen als erste bei Herztransplantierten eine erhöhte Dichte von ET-Rezeptoren in arteriosklerotischen Plaques der Koronararterien nach (Chester et al. 1989). Weissberg et al. fanden bei Patienten mit fortgeschrittener Arteriosklerose erhöhte Plasma- sowie Gewebs-ET-1-Spiegel (Weissberg et al., Lerman et al. 1991). Außerdem konnte bei Patienten mit Arteriosklerose eine veränderte Reagibilität auf ET-1 sowie eine erhöhte Expression von ET_B-Rezeptoren auf Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden (Iwasa et al. 1999, Fan et al. 2000) (Unoki et al. 2000, Pernow et al. 2000).

4.4 Bemerkungen zu Interaktionen zwischen Sympathischem Nervensystem und Endothelinsystem

In vielen Studien konnte eine Aktivierung des Sympathischen Nervensystems bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen werden (Sinski et al. 2006). Eine Reihe von in vitro- und tierexperimentellen Arbeiten weisen zudem auf Interaktionen zwischen dem Endothelinsystem und dem Sympathischen Nervensystem hin.

So konnten Jiang et al. bei Mäusen eine NA-induzierte Vasokonstriktion in der Aorta ex-vivo durch den selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten BQ123 inhibieren (Jiang et al. 2000). Wenzel et al. konnten in der hiesigen Klinik beim Menschen eine durch NA und Angiotensin II ausgelöste Vasokonstriktion in der Hautmikrozirkulation sowohl durch den lokalen selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten BQ123 als auch durch den systemisch wirkenden oralen ET_A-Rezeptorantagonisten Darusentan inhibieren (Wenzel et al. 2001).

4.5 Diskussion der Ergebnisse

In unserer Untersuchung führte die lokale Injektion von ET-1 bei Patienten mit Arteriosklerose zu einer ausgeprägteren Vasokonstriktion als bei gesunden Kontrollen. Ziel unserer Arbeit war, die Rolle der ET-1-Rezeptor-Subtypen bei Patienten mit Arteriosklerose näher zu definieren. Unserer Arbeitshypothese entsprechend, hemmte die selektive Blockade von ET_B-Rezeptoren nur bei Patienten, nicht aber bei den gesunden Probanden, die ET-1 induzierte Vasokonstriktion. Die Effekte einer ET_A-Rezeptor-Blockade unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht.

Die differente Wirkung der selektiven ET_B-Rezeptor-Blockade bei Patienten und Probanden könnte auf eine unterschiedliche Rezeptorverteilung in beiden Gruppen zurückzuführen sein.

ET-1 vermittelt seine vasokonstringierende Wirkung am Gefäßsystem hauptsächlich über ET_A- und ET_{B2}-Rezeptor auf glatten Gefäßmuskeln. Eine vorwiegend dilatierende Wirkung wird den auf dem Endothel vorkommenden ET_{B1}-Rezeptoren zugeschrieben (Haynes et al. 1995, Böhm et al 2007).

In der Literatur gibt es viele Hinweise für eine unterschiedliche Wirkung von vasoaktiven Substanzen bei Patienten mit Arteriosklerose im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Dass bei Patienten mit Arteriosklerose eine erhöhte Reagibilität auf exogen zugeführtes ET-1 besteht, konnte bereits 1994 von der Arbeitsgruppe um Haynes gezeigt werden. Sie untersuchten bei Patienten mit arterieller Hypertonie die Wirkungen von vasoaktiven Substanzen (ET-1, NA) auf die Handvenenzirkulation (Haynes et al. 1994).

Jiang et al. konnten in einer tierexperimentellen in-vitro-Studie an arteriosklerotischen Mäusearterien ebenfalls eine verstärkte Vasokonstriktion durch exogenes ET-1 hervorrufen (Jiang et al. 2000).

Verschiedene Forschungsgruppen postulieren eine Rezeptorumverteilung bei Arteriosklerose, die zu einer Zunahme vasokonstringierend wirkender ET_{B2}-

Rezeptoren führt (Wenzel et al. 1996, Pernow et al. 2000, Böhm et al. 2002, Dagassan et al. 1996, Johansson et al. 2008).

Für Menschen in vivo gab es bisher nur indirekte Hinweise auf eine Beteiligung vaskonstringierend wirkender ET_B -Rezeptoren an der ET-1 vermittelten Vasokonstriktion. Unsere Studie weist durch die selektive Blockade von ET_B -Rezeptoren deren direkte Beteiligung an der ET-1 vermittelten Vasokonstriktion bei Patienten mit Arteriosklerose nach. Die Bedeutung vaskonstringierender ET_B -Rezeptoren für den basalen Gefäßtonus in der Mikrozirkulation von Patienten mit Arteriosklerose wird dadurch unterstrichen, dass auch die Gabe des selektiven ET_B -Rezeptorantagonisten BQ788 alleine bei den Patienten bereits eine deutliche Vasodilatation hervorrufen konnte.

Wenzel et al. konnten bei Patienten mit Arteriosklerose die durch ET-1- und NA-induzierte Vasokonstriktion durch einen kombinierten ET_A/ET_B -Rezeptorantagonisten stärker inhibieren als mit einem selektiven ET_A -Rezeptorantagonisten, was für die stärkere Wirkung der ET_{B2} -Rezeptoren auf den Gefäßmuskelnzellen bei Patienten mit Arteriosklerose spricht (Wenzel et al. 1996). Diese Ergebnisse konnten durch Böhm et al. reproduziert werden: Wie in unserer Studie führte die isolierte Injektion eines ET_A -Rezeptorantagonisten bei Patienten und Kontrollen zu einer Zunahme des Blutflusses am Unterarm. Die kombinierte Blockade des ET_A - und ET_B -Rezeptors führte aber lediglich bei den Patienten mit Arteriosklerose zu einer Vasodilatation und damit zu einem Blutflussanstieg im Unterarm (Böhm et al. 2002).

Die Arbeitsgruppe um Pernow untersuchte die Wirkung des ET_B -Rezeptoragonisten Sarafotoxin 6c (S6c) bei Patienten mit Arteriosklerose. Sie konnten eine länger andauernde Vasokonstriktion im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zeigen. S6c wurde in dieser Studie in die A. brachialis injiziert und die Perfusionsänderung mittels Venenverschlussplethysmographie gemessen (Pernow et al. 2000). Die Autoren postulierten eine Up-Regulation der vaskonstringierenden ET_B -Rezeptoren auf den Gefäßmuskelnzellen.

Wackenfort et al. untersuchten die Rezeptorverteilung an Koronarien von Patienten mit KHK mittels Analyse der messenger-RNS. Sie konnten eine erhöhte Dichte an ET_A- und ET_B- Rezeptoren bei KHK, eine Zunahme der ET_B-Rezeptoren nach 48h Inkubation der Gefäßwände sowie eine daraufhin verstärkte Vasokonstriktion durch den ET_B-Rezeptoragonisten S6c zeigen (Wackenfors et al. 2004).

Die Arbeitsgruppe um Johansson untersuchte mittels mRNA Analyse die Koronarien von Ratten. Sie konnten nach Inkubation der Koronarien mittels mRNA eine erhöhte Anzahl an ET_B-Rezeptoren sowie eine erniedrigte Anzahl an ET_A-Rezeptoren nachweisen. Nach Inkubation der Koronarien konnte eine signifikant stärkere Vasokonstriktion durch Sarafotoxin 6c erreicht werden. Eine ET_B-Blockade führte in den kultivierten Zellen zu einer Potenzierung der Vasokonstriktion. Die Autoren erklärten dies mit einer Up-Regulation von vasokonstringierenden ET_B-Rezeptoren auf den Gefäßmuskelzellen (Johansson et al. 2008).

Möglicherweise induzieren auch Lipide im Blut die Expression von ET_B-Rezeptoren. Haug et al. konnte in einer in vitro Studie nach Inkubation von menschlichen Koronararterien mit LDL die Expression von ET_B-Rezeptoren mittels mRNA Analyse zeigen (Haug et al 2001). Diese Ergebnisse konnten von der Arbeitsgruppe um Müller für menschliche Nabelvenen reproduziert werden (Müller et al. 2006). Unsere Patienten wurden alle mit einem Cholesterinsenkenden Medikament behandelt und wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine erhöhten Cholesterinwerte auf. Eine quantitative ET_B-Rezeptordichtemessung wurde nicht durchgeführt.

Auch Nilsson et al untersuchten die Rezeptorverteilung an Schweinearterien. Sie konnten nach 24h Kultivierung der Gefäße eine stärkere Vasokonstriktion durch den ET_B-Rezeptoragonisten S6c zeigen und eine Abnahme der endothelialen ET_B-Rezeptoren mittels Immunofluoreszens nachweisen (Nilsson et al. 2008).

Clozel et al. sehen erhöhte Endothelinspiegel als mögliche Ursache für eine konsekutive Downregulation von Endothelinrezeptoren (Clozel et al. 1993). Warum

bei kardiovaskulären Erkrankungen die Endothelinspiegel häufig erhöht sind, ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Lerman et al. postulieren eine vermehrte Freisetzung von ET-1 aus zerstörten Endothelzellen und eine vermehrte Produktion in hypertrophen Gefäßmuskelzellen (Lerman et al. 1991). Böhm et al. halten die Aktivierung des ECE bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen für pathogenetisch bedeutsam. ECE katalysiert den letzten Schritt der ET-1 Biosynthese, die Umwandlung von Big-ET-1 zu ET-1 (Böhm et al. 2002). ET-1 ist allerdings ein vorwiegend parakrines Hormon, Serumspiegel geben daher keine sichere Auskunft über die ET-1 Aktivität. (Morganti et al. 2000, Wagner et al. 1992). Wir haben in unserer Studie daher keine ET-1 Spiegel bestimmt.

Neben einer Rezeptorverteilung kann auch eine endotheliale Dysfunktion, wie sie für Patienten mit Arteriosklerose postuliert wird, zu diesen Ergebnissen beigetragen haben: in diesem Fall würde die Freisetzung endothelialer Vasodilatoren wie NO und Prostaglandine über ET_B-Rezeptoren als Gegenregulator der Vasokonstriktion entfallen.

Erneut ergaben sich für die Rezeptor-Subklassen unterschiedliche Ergebnisse. Eine ET_A-Rezeptor-Blockade hemmte die NA- induzierte Vasokonstriktion sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen. Die ET_B-Rezeptor-Blockade hemmte die NA- Vasokonstriktion hingegen nur bei Patienten mit Arteriosklerose.

Unsere Ergebnisse weisen zum einen auf signifikante Interaktionen zwischen Sympathikus und dem Endothelinsystem hin, zum anderen zeigen sie erneut die Bedeutung vaskonstringierend wirkender ET_B-Rezeptoren bei Patienten mit Arteriosklerose auf. Unter physiologischen Bedingungen bei Gesunden scheint beim Menschen die ET-1-induzierte Vasokonstriktion nahezu ausschließlich über ET_A-Rezeptoren vermittelt zu sein.

Zusammenfassend konnten wir in unserer Studie zeigen, dass bei Arteriosklerose die ET-1- induzierte Vasokonstriktion in der Mikrozirkulation nicht nur über ET_A- Rezeptoren, sondern auch über konstringierend wirkende ET_B-Rezeptoren vermittelt wird. Eine Aussage über eine ursächliche Up-Regulation vaskonstringierender ET_B-Rezeptoren oder eine mögliche down-Regulation

endothelialer ET_B-Rezeptoren kann anhand unserer Ergebnisse nicht getroffen werden.

Unsere zweite Arbeitshypothese postulierte Wechselwirkungen zwischen dem Endothelinsystem und dem sympathischen Nervensystem in Abhängigkeit von einer vorliegenden Arteriosklerose.

Andere Forschergruppen konnten bereits in Tierversuchen Hinweise für Interaktionen zwischen dem Endothelinsystem und dem Sympathischen Nervensystem zeigen (Yang et al. 1990, Zerrouk et al. 1997, Vila et al. 2001).

Bereits 1990 konnte die Arbeitsgruppe um Yang eine Potenzierung der NA-induzierten Vasokonstriktion durch ET-1 demonstrieren. Untersucht wurde hierbei die Vasokonstriktion der A. mammaria in vitro (Yang et al. 1990). Die Arbeitsgruppe um Zerrouk konnte in ihrer Studie eine potenzierende Wirkung von ET-1 auf die durch NA induzierte Konstriktion an der thorakalen Aorta von hypertensiven Ratten zeigen (Zerrouk et al. 1997). Vila et al konnten ebenfalls eine Potenzierung durch ET-1 zeigen. Sie untersuchten die NA-induzierte Vasokonstriktion bei Pulmonalarterien von Kaninchen in vitro. Gemessen wurde hierbei die isometrische Kontraktion. Die Potenzierung konnte durch einen ET_B-Antagonisten inhibiert werden (Vila et al. 2001).

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit unseren aktuellen Resultaten sowie den vorgängigen Studien aus unserem Labor: Gössl et al. untersuchten die Mikrozirkulation am Unterarm von 14 gesunde Probanden. Sie konnten in ihrer Studie die NA induzierte Vasokonstriktion durch kombinierte ET_A/ET_B-Blockade vollkommen aufheben (Gössl et al 2004). In einer weiteren Studie konnten Wenzel et al. bei 20 gesunden Probanden die NA induzierte Vasokonstriktion in der Hautmikrozirkulation durch ET_A-Rezeptorblockade inhibieren, wohingegen die Blockade der ET_B-Rezeptoren keine Effekt auf die Vasokonstriktion zeigte (Wenzel et al 2001).

Die Autoren postulierten, dass die Wirkung von NA durch das endogene ET-1 potenziert wird und dadurch eine ET-1-Blockade zu einer Abnahme der NA-

induzierten Vasokonstriktion führt. Unseren Ergebnissen zufolge scheint bei Patienten mit Arteriosklerose die potenzierende Wirkung von ET-1 vor allem über ET_B-Rezeptoren vermittelt zu sein.

Zusammenfassend kommt den ET_B- Rezeptoren in unserem Modell der Hautmikrozirkulation sowohl für die ET-1 als auch für die NA-vermittelte Vasokonstriktion eine bedeutende Rolle zu. Diese Ergebnisse sind nicht notwendigerweise auf andere Bereiche der menschlichen Zirkulation übertragbar, bestätigen und ergänzen aber wesentlich die bereits vorliegenden in vitro und tierexperimentellen Daten.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Im Endothelinsystem sind verschiedene Rezeptoren an der Signaltransduktion beteiligt. Beim Menschen spielen dabei vor allem ET_A- und ET_B-Rezeptoren eine führende Rolle. Die ET_A-Rezeptoren auf den Gefäßmuskelzellen vermitteln dabei die Endothelin-1 (ET-1) induzierte Vasokonstriktion, während die Stimulation von ET_B-Rezeptoren abhängig von ihrer Lokalisation auf Gefäßmuskelzellen oder Endothelzellen eine Vasokonstriktion sowie eine Vasodilatation auslösen kann. Bei Gesunden überwiegen nach Stimulation der ET_B-Rezeptoren vasodilatierende Effekte.

Nur wenig ist über die Funktion der konstringierend wirkenden ET_B-Rezeptoren im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen und endothelialer Dysfunktion bekannt. Aus Tierversuchen und in vitro-Untersuchungen ist anzunehmen, dass Wechselwirkungen zwischen dem Endothelinsystem und dem Sympathischen Nervensystem zu einer zu einer Potenzierung der sympathisch vermittelten Vasokonstriktion durch ET-1 führen. Zur Identifizierung der Bedeutung von ET_B-Rezeptoren und Beschreibung möglicher Interaktionen zwischen ET-1 und Noradrenalin (NA) untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit den Einfluss von ET_A- und ET_B-Rezeptoren auf die ET-1 und NA- induzierte Vasokonstriktion in der Hautmikrozirkulation von 19 Patienten mit Arteriosklerose und 20 gesunden Kontrollen mittels der Triple-Injektionstechnik und eines Laser-Doppler-Imagers.

ET-1 und NA induzierten in beiden Gruppen eine signifikante Vasokonstriktion in der Hautmikrozirkulation. Nicht nur die ET-1-, sondern auch die NA- induzierte Vasokonstriktion konnte durch den selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten BQ123 in beiden Gruppen signifikant reduziert werden. Der selektive ET_B-Rezeptorantagonist BQ788 hatte lediglich in der Gruppe der Patienten einen hochsignifikanten inhibitorischen Effekt auf die NA- und ET-1- induzierte Vasokonstriktion.

Unsere Ergebnisse im in vivo Modell der Hautmikrozirkulation weisen damit den ET_B-Rezeptoren bei Patienten mit Arteriosklerose eine bedeutende Rolle zu. Diese Ergebnisse müssen noch für andere Bereiche der Zirkulation bestätigt werden.

Publikation:

A. Mitchell, U. Rushentsova, **N. Detmer**, T. Philipp, R.R. Wenzel. Evidence for constrictive ET-B-receptors in the skin microcirculation of patients with atherosclerosis. Journal of Hypertension, Jun 2005; Suppl.:303 (abstract).

6. Literaturverzeichnis

1. Black, H. R., G. L. Bakris, et al. (2007). "Efficacy and safety of darusentan in patients with resistant hypertension: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study." J Clin Hypertens (Greenwich) **9**(10): 760-9.
2. Böhm, F., G. Ahlborg, et al. (2002). "Combined endothelin receptor blockade evokes enhanced vasodilatation in patients with atherosclerosis". Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(4): 674-9
3. Böhm, F., B. L. Johansson, U. Hedin, K. Alving and J. Pernow (2002). "Enhanced vasoconstrictor effect of big endothelin-1 in patients with atherosclerosis: relation to conversion to endothelin-1." Atherosclerosis **160**(1): 215-22.
4. Böhm, F. and J. Pernow (2007). "The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease." Cardiovasc Res **76**(1): 8-18.
5. Bundesamt, Statistisches. (2009). "Todesursachen 2008." Pressemitteilung 344 vom 15.09.2009. Online-Publikation:
http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2009/09/PD09_344_232,templateId=renderPrint.psml
6. Channick, R., D. B. Badesch, et al. (2001). "Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a placebo-controlled study." J Heart Lung Transplant **20**(2): 262-263.
7. Chester, A. H., M. R. Dashwood, et al. (1989). "Influence of endothelin on human coronary arteries and localization of its binding sites." Am J Cardiol **63**(18): 1395-8.
8. Clozel, M., B. M. Loffler, et al. (1993). "Downregulation of endothelin receptors by autocrine production of endothelin-1." Am J Physiol **265**(1 Pt 1): C188-92.
9. Dagassan, P. H., V. Breu, et al. (1996). "Up-regulation of endothelin-B receptors in atherosclerotic human coronary arteries." J Cardiovasc Pharmacol **27**(1): 147-53.

-
10. Damon, D. H. (1999). "Endothelin and post-ganglionic sympathetic neurons." Clin Exp Pharmacol Physiol **26**(12): 1000-3.
 11. Dupuis, J. and M. M. Hoeper (2008). "Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **31**(2): 407-15.
 12. Ehrenreich, H., R. W. Anderson, et al. (1990). "Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages." J Exp Med **172**(6): 1741-8.
 13. Fan, J., H. Unoki, et al. (2000). "Role of endothelin-1 in atherosclerosis." Ann N Y Acad Sci **902**: 84-93; discussion 93-4.
 14. Galie, N., L. Rubin, et al. (2008). "Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial." Lancet **371**(9630): 2093-100.
 15. Garcia-Villalon, A. L., L. Monge, et al. (1999). "Basal inhibitory action of endogenous endothelin on the sympathetic contraction in the isolated rat tail artery." Eur J Pharmacol **384**(2-3): 163-7.
 16. Gariepy, C. E., D. T. Cass, et al. (1996). "Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 867-72.
 17. Goddard, J. and D. J. Webb (2000). "Plasma endothelin concentrations in hypertension." J Cardiovasc Pharmacol **35**(4 Suppl 2): S25-31.
 18. Gössl, M., A. Mitchell, et al. (2004). "Endothelin-B-receptor-selective antagonist inhibits endothelin-1 induced potentiation on the vasoconstriction to noradrenaline and angiotensin II." J Hypertens **22**(10): 1909-16.
 19. Griendling, K. K., T. Tsuda, et al. (1989). "Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **264**(14): 8237-40.
 20. Gulbins, E., Lang F. (2005): Signaltransduktion. In: Schmid, R. F., Lang, F., Thews, G.H. (Hrsg.): Physiologie des Menschen. 29 Auflage; S.26-32. Berlin, Heidelberg, New York: Springer- Verlag.
 21. Haug, C., A. Schmid-Kotsas, et al. (2001). "Endothelin-1 synthesis and endothelin B receptor expression in human coronary artery smooth muscle cells and monocyte-derived macrophages is up-regulated by low density lipoproteins." J Mol Cell Cardiol **33**(9): 1701-12.

-
22. Haynes, W. G., C. E. Ferro, et al. (1995). "Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans." J Cardiovasc Pharmacol **26 Suppl 3**: S183-5.
23. Haynes, W. G., M. F. Hand, et al. (1994). "Direct and sympathetically mediated venoconstriction in essential hypertension. Enhanced responses to endothelin-1." J Clin Invest **94**(4): 1359-64.
24. Hoeper, M. M., M. Halank, et al. (2005). "Bosentan therapy for portopulmonary hypertension." Eur Respir J **25**(3): 502-8.
25. Hofman, F. M., P. Chen, et al. (1998). "Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells." Blood **92**(9): 3064-72.
26. Hori, S., Y. Komatsu, et al. (1992). "Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors." Endocrinology **130**(4): 1885-95.
27. Hosoda, K., R. E. Hammer, et al. (1994). "Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice." Cell **79**(7): 1267-76.
28. Iwasa, S., J. Fan, et al. (1999). "Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis." Atherosclerosis **146**(1): 93-100.
29. Jiang, J., G. Valen, et al. (2000). "Endothelial dysfunction in atherosclerotic mice: improved relaxation by combined supplementation with L-arginine-tetrahydrobiopterin and enhanced vasoconstriction by endothelin." Br J Pharmacol **131**(7): 1255-61.
30. Johnsson, E., A. Maddahi, et al. (2008). "Enhanced expression of contractile endothelin ET(B) receptors in rat coronary artery after organ culture." Eur J Pharmacol **582**(1-3): 94-101.
31. Kawano, Y., K. Yoshida, et al. (1989). "The cardiovascular effect of intracerebroventricular endothelin in rats." J Hypertens Suppl **7**(6): S22-3.
32. Kodama, M., H. Kanaide, et al. (1989). "Endothelin-induced Ca-independent contraction of the porcine coronary artery." Biochem Biophys Res Commun **160**(3): 1302-8.

-
33. Korn, J. H., M. Mayes, et al. (2004). "Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist." Arthritis Rheum **50**(12): 3985-93.
34. Krum, H., R. J. Viskoper, et al. (1998). "The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators." N Engl J Med **338**(12): 784-90.
35. Kuwaki, T., G. Y. Ling, et al. (1999). "Endothelin in the central control of cardiovascular and respiratory functions." Clin Exp Pharmacol Physiol **26**(12): 989-94.
36. Lerman, A., B. S. Edwards, et al. (1991). "Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis." N Engl J Med **325**(14): 997-1001.
37. Leitlinien der Deutschen Hochdruckliga (2008) online-publikation: <http://www.awmf.org/leitlinien/leitlinienprogramme.html>
38. Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-74.
39. Lüllmann, K.L., Mohr, K.M., (1999): Vegetatives Nervensystem. In Pharmakologie und Toxikologie; Auflage 14, Stuttgart, Thieme Verlag; Seite 54-88
40. Lüscher, T. F. and M. Barton (2000). "Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs." Circulation **102**(19): 2434-40.
41. Mitchell, A., U. Rushentsova, et al. (2006). "The angiotensin II receptor antagonist valsartan inhibits endothelin 1-induced vasoconstriction in the skin microcirculation in humans in vivo: influence of the G-protein beta3 subunit (GNB3) C825T polymorphism." Clin Pharmacol Ther **79**(3): 274-81.
42. Mitchell, J. A., F. Ali, et al. (2008). "Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium." Exp Physiol **93**(1): 141-7.
43. Müller, G., R. A. Catar, et al. (2006). "Upregulation of endothelin receptor B in human endothelial cells by low-density lipoproteins." Exp Biol Med (Maywood) **231**(6): 766-71.

-
44. Nakov, R., E. Pfarr, et al. (2002). "Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension." Am J Hypertens **15**(7 Pt 1): 583-9.
45. Niazi, Z. B., T. J. Essex, et al. (1993). "New laser Doppler scanner, a valuable adjunct in burn depth assessment." Burns **19**(6): 485-9.
46. Nilsson, D., A. Wackenfors, et al. (2008). "Endothelin receptor-mediated vasodilatation: effects of organ culture." Eur J Pharmacol **579**(1-3): 233-40.
47. Nilsson, G. E., T. Tenland, et al. (1980). "Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow." IEEE Trans Biomed Eng **27**(10): 597-604.
48. Noll, G., R. R. Wenzel, et al. (1996). "Increased activation of sympathetic nervous system and endothelin by mental stress in normotensive offspring of hypertensive parents." Circulation **93**(5): 866-9.
49. Ogawa, Y., K. Nakao, et al. (1991). "Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor." Biochem Biophys Res Commun **178**(1): 248-55.
50. Ohlstein, E. H., A. Arleth, et al. (1992). "The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis." Eur J Pharmacol **225**(4): 347-50.
51. Opazo Saez, A. M., F. Mosel, et al. (2005). "Laser Doppler imager (LDI) scanner and intradermal injection for in vivo pharmacology in human skin microcirculation: responses to acetylcholine, endothelin-1 and their repeatability." Br J Clin Pharmacol **59**(5): 511-9.
52. Pape, S. A., C. A. Skouras, et al. (2001). "An audit of the use of laser Doppler imaging (LDI) in the assessment of burns of intermediate depth." Burns **27**(3): 233-9.
53. Pernow, J., F. Bohm, et al. (2000). "Enhanced vasoconstrictor response to endothelin-B-receptor stimulation in patients with atherosclerosis." J Cardiovasc Pharmacol **36**(5 Suppl 1): S418-20.
54. Resink, T. J., T. Scott-Burden, et al. (1988). "Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **157**(3): 1360-8.
55. Richardson, M. and J. D. Robishaw (1999). "The alpha2A-adrenergic receptor discriminates between Gi heterotrimers of different betagamma

-
- subunit composition in Sf9 insect cell membranes." J Biol Chem **274**(19): 13525-33.
56. Rossi, G. P., S. Colonna, et al. (1999). "Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo." Circulation **99**(9): 1147-55.
57. Rubin, L. J., D. B. Badesch, et al. (2002). "Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **346**(12): 896-903.
58. Rütten, H. and C. Thiemermann (1997). "Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone." J Physiol Pharmacol **48**(4): 675-88.
59. Schwartz, S. M., D. deBlois, et al. (1995). "The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis." Circ Res **77**(3): 445-65.
60. Shi, Y., M. Pieniek, et al. (1996). "Adventitial remodeling after coronary arterial injury." Circulation **93**(2): 340-8.
61. Sinski, M., J. Lewandowski, et al. (2006). "Why study sympathetic nervous system?" J Physiol Pharmacol **57 Suppl 11**: 79-92.
62. Strachan, F. E., J. C. Spratt, et al. (1999). "Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men." Hypertension **33**(1 Pt 2): 581-5.
63. Vila, J. M., P. Medina, et al. (2001). "Endothelin-1-induced potentiation of adrenergic responses in the rabbit pulmonary artery: role of thromboxane A(2)." Eur J Pharmacol **413**(2-3): 247-54.
64. Wackenfors, A., M. Emilson, et al. (2004). "Ischemic heart disease induces upregulation of endothelin receptor mRNA in human coronary arteries." Eur J Pharmacol **484**(1): 103-9.
65. Wagner, O. F., G. Christ, et al. (1992). "Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells." J Biol Chem **267**(23): 16066-8.
66. Weber, M. A., H. Black, et al. (2009). "A selective endothelin-receptor antagonist to reduce blood pressure in patients with treatment-resistant hypertension: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." Lancet **374**(9699): 1423-31.
67. Weissberg, P. L., C. Witchell, et al. (1990). "The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived

-
- growth factor for vascular smooth muscle cells." Atherosclerosis **85**(2-3): 257-62.
68. Wenzel, R. R., N. Duthiers, et al. (1996). "Endothelin and calcium antagonists in the skin microcirculation of patients with coronary artery disease." Circulation **94**(3): 316-22.
69. Wenzel, R. R., J. Ruthemann, et al. (2001). "Endothelin-A receptor antagonist inhibits angiotensin II and noradrenaline in man." Br J Clin Pharmacol **52**(2): 151-7.
70. Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-5.
71. Yang, Z. H., V. Richard, et al. (1990). "Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. A new mechanism of vasospasm?" Circulation **82**(1): 188-95.
72. Zerrouk, A., P. Champeroux, et al. (1997). "Role of endothelium in the endothelin-1-mediated potentiation of the norepinephrine response in the aorta of hypertensive rats." J Hypertens **15**(10): 1101-11.
73. Zollmann, F. S. and M. Paul (2000). "Transgenic models for the study of endothelin function in the cardiovascular system." J Cardiovasc Pharmacol **35**(4 Suppl 2): S13-6.

7. Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
BMI	Body-Mass-Index
BQ 123	Selektiver Endothelin- _A -Rezeptorantagonist
BQ 788	Selektiver Endothelin- _B -Rezeptorantagonist
ET-1	Endothelin-1
ET _A	Endothelin- _A -Rezeptor
ET _{B1}	Endothelin- _{B1} -Rezeptor
ET _{B2}	Endothelin- _{B2} -Rezeptor
ETS	Endothelinsystem
ECE	Endothelin-Converting-Enzym
GMP	Guanosin Monophosphat
G-Protein	Guanine nucleotide binding regulatory protein
HF	Herzfrequenz
HDL	High density lipoproteins
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDF	Laser Doppler Fluxmetrie
LDI	Laser Doppler Imager
LDS	Laser Doppler Scanner
LDL	Low density lipoproteins
N	Anzahl der Patienten
NA	Noradrenalin
NPN	Nitropussid-Natrium
NO	Stickstoffmonoxid
Pat.	Patienten
PU	Perfusion Units
RU	Relative Units
ROI	Region of Interest

8. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Priv.-Doz. Dr. med. Anna Mitchell für die Unterstützung bei der Versuchsplanung und Durchführung, der Analyse der Ergebnisse sowie der Anfertigung der Arbeit bedanken.

Ich möchte mich bei Dr. med. Uljana Rushentsova für die Unterstützung beim Erlernen der Methode, bei der Versuchsdurchführung und besonders für die Mitbetreuung der Probanden recht herzlich bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. med. Özgür Yaldizli für das Korrekturlesen.

Mein Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R.R. Wenzel für die Überlassung des Themas.

Ich möchte mich bei Christa Freundlieb für die stets freundliche Hilfestellung bei vielen organisatorischen Fragen bedanken.

Ich bedanke mich bei meinen Patientinnen und Patienten sowie Probandinnen und Probanden, die mehrmals zu Versuchsterminen erschienen sind und ohne die diese Arbeit nicht möglich geworden wäre.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes in der Online-Version nicht enthalten